

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR

FUNCIÓN DE LOS PROTEASOMAS EN LA DEGRADACIÓN
INTRACELULAR DE PROTEÍNAS EN CÉLULAS DE MAMÍFERO.

GRACIELA FUERTES SEDER

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2004

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 05 de Febrer de 2004 davant un tribunal format per:

- Dr. D. José Cabo Soler
- Dr. D. José Hernández Yago
- Dra. D^a. Isabel Fariñas Gómez
- Dr. D. Pascual Sanz Iborra
- Dr. D. Joaquín Timoneda Timoneda

Va ser dirigida per:

D. Erwin Knecht Roberto

D. José Javier Martín De Llano

©Copyright: Servei de Publicacions
Graciela Fuertes Seder

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-5952-6

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Instituto de Investigaciones Citológicas
Fundación Valenciana de Investigaciones Biomédicas



*Función de los proteasomas
en la degradación intracelular de proteínas
en células de mamífero*

Memoria presentada por
Dña. Graciela Fuertes Seder,
Lda. en Ciencias Biológicas,
para optar al grado de Doctor
Valencia, 2003

ERWIN KNECHT ROBERTO y JOSÉ JAVIER MARTÍN DE LLANO *

Investigadores del Instituto de Investigaciones Citológicas de la Fundación Valenciana de Investigaciones Biomédicas,

CERTIFICAN

que la presente Tesis Doctoral: "*Función de los proteasomas en la degradación intracelular de proteínas en células de mamífero.*" ha sido realizada, bajo su dirección, por la Licenciada en Ciencias Biológicas Dña. **Graciela Fuertes Seder** y que, habiendo revisado el trabajo, consideran que reúne las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Y para que conste a los efectos oportunos, se expide la presente certificación en Valencia, a 20 de octubre de 2003.

Fdo. Erwin Knecht Roberto

Fdo. José Javier Martín de Llano

* En la actualidad, investigador de la Fundación Hospital General Universitario de Valencia.

A mi familia.

Este trabajo de Tesis doctoral se ha realizado gracias a las ayudas concedidas por el Ministerio de Ciencia y Tecnología (proyectos BMC2001-0816 y SAF2002-00206) y por el Fondo de Investigación Sanitaria (proyecto F.I.S. 02/1874). La autora ha disfrutado de una beca predoctoral concedida por el Instituto de Investigaciones Citológicas de la Fundación Valenciana de Investigaciones Biomédicas.

3-MA: 3-metiladenina.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ALLN: N-acetil-Leu-Leu-Norleu-al.

ALLM: acetil-Leu-Leu-Met-al.

ATCC: American Type Culture Collection.

ATP: Adenosina 5'-trifosfato.

BCIP: ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato.

BSA: albúmina de suero bovino.

CHO: células de ovario de hámster chino.

Ci: curio.

COS: células de riñón de mono verde africano.

Da: Dalton.

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol dihidrocloruro.

DEAE: dietil amino etil.

DMEM: medio mínimo esencial de Eagle modificado por Dulbecco.

DiI: 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina.

DMSO: dimetilsulfóxido.

DRIPs: productos ribosomales defectuosos.

DTT: ditioneitol.

EDTA: ácido etilendiaminotetracético.

EGF: factor de crecimiento epidérmico.

FCS: suero fetal bovino.

FITC: isotiocianato de fluoresceína.

FPLC: cromatografía líquida rápida de proteínas.

g: fuerza centrífuga relativa.

Ham's F-12: mezcla de nutrientes F-12 de Ham.

HEPES: ácido [2-(4-2-hidroximetil)-1-piperacil]-etanosulfónico.

HF: Hipercolesterolemia Familiar.

HMG CoA reductasa: 3-hidroxi-3-metil glutaril Coenzima A reductasa.

IgG: inmunoglobulina G.

L-132: línea celular derivada de pulmón embrionario humano.

LDL: lipoproteínas de baja densidad.

- LPDS:** suero fetal bovino deficiente en lipoproteínas.
- MCP:** complejo de la proteinasa multicatalítica o proteasoma.
- ME:** microscopía electrónica.
- MEM:** medio mínimo esencial.
- MG132:** aldehído Z-Leu-Leu-Leu-H (Z representa benciloxicarbonilo).
- MG262:** Z-Leu-Leu-Leu-B(OH)₂ (Z representa benciloxicarbonilo).
- MHC:** complejo principal de histocompatibilidad.
- NBT:** cloruro de tetranitrotetrazolio.
- p/v:** relación peso/volumen.
- PAGE-SDS:** electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS.
- pb:** pares de bases.
- PBS:** tampón fosfato salino.
- PI3K:** 3´fosfatidil inositol quinasas.
- PMSF:** fluoruro de fenilmetanosulfonilo.
- PPO:** 2,5-difeniloxazol.
- RE:** retículo endoplásmico.
- RIPA:** tampón de inmunoprecipitación.
- rLDL:** receptor de lipoproteínas de baja densidad.
- rpm:** revoluciones por minuto.
- S.D.:** desviación estándar.
- SDS:** dodecil sulfato sódico.
- SW:** ausencia de suero.
- t_{1/2}:** vida media.
- TAP:** transportador de péptidos antigénicos.
- TCA:** ácido tricloroacético.
- TBS:** tampón Tris salino.
- TEMED:** N,N,N',N'-tetrametiletildiamina.
- Tris:** tris-hidroximetil-aminometano.
- Ub:** ubiquitina.
- v/v :** relación volúmen/volúmen.
- VMC:** proteínas de vida media corta.
- VML:** proteínas de vida media larga.

ÍNDICE

Introducción	1
1. Proteasomas	4
1.1 Proteasomas 20S	4
1.1.1 Proteasoma 20S	4
1.1.2 Inmunoproteasoma	6
1.2. Complejos reguladores del proteasoma 20S	7
1.2.1. Complejo 19S	7
1.2.2 Complejo 11S	8
1.2.3 Proteasomas mixtos PA28/19S	9
2. Sistema lisosomal	10
2.1 Macroautofagia	11
2.2 No macroautofagia	11
3. Otras vías no proteasomales y no lisosomales	14
4. Estudio de la degradación del receptor de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), una proteína de relevancia fisiológica y patológica	16
4.1 Estructura del receptor de LDL	17
4.2 Metabolismo del receptor de LDL	19
4.3 Mutaciones en el gen del receptor de LDL	20
Objetivos	23
Resultados	27
1. Localización subcelular de los proteasomas y de sus complejos reguladores en células de mamífero	29
1.1 Niveles de proteasomas en las fracciones nuclear, mitocondrial, microsomal y citosólica de hígado de rata, detectados por inmunotransferencia	29
1.2 Localización precisa de proteasomas en la fracción microsomal	31
1.3 Distribución de diferentes subunidades del proteasoma y de los complejos que lo regulan en las fracciones nuclear, microsomal y citosólica de hígado de rata	34
1.4 Análisis de la presencia de subunidades libres de proteasomas o de sus complejos reguladores en hígado de rata	37
1.5 Proporción relativa y distribución de los proteasomas 20S y 26S, y del complejo regulador PA28 en cultivos celulares	40
2. Contribución de los proteasomas y de otras vías proteolíticas a la degradación intracelular de proteínas, en fibroblastos humanos en diferentes condiciones de crecimiento	43
2.1 Análisis de diferentes inhibidores de las vías proteolíticas proteasomales y lisosomales	43
2.2 Contribución de las principales vías proteolíticas a la degradación de proteínas de vida media corta	48
2.2.1 Cinéticas de degradación de proteínas marcadas durante pulsos de 5, 15, 30 y 60 min en fibroblastos humanos	48
2.2.2 Cinéticas de degradación de proteínas marcadas durante 15 min en fibroblastos humanos en diferentes condiciones de	

crecimiento	52
2.2.3 Contribución de los proteasomas y de otras vías proteolíticas a la degradación de las proteínas de vida media corta en diferentes condiciones de crecimiento	55
2.3 Contribución de las principales vías proteolíticas a la degradación de proteínas de vida media larga	59
2.3.1 Cinéticas de degradación de proteínas de vida media larga, marcadas radiactivamente durante 48 h, en fibroblastos humanos en diferentes condiciones de crecimiento	59
2.3.2 Contribución de las principales vías proteolíticas a la degradación de proteínas de vida media larga, en fibroblastos humanos en diferentes condiciones de crecimiento	61
2.3.3 Cambios en los niveles de lisosomas y proteasomas en fibroblastos humanos en diferentes condiciones de crecimiento	63
2.3.4 Contribución de las diferentes vías proteolíticas a la degradación intracelular de proteínas de vida media larga en fibroblastos humanos en ayuno prolongado	68
2.3.5 Contribución de las diferentes vías proteolíticas a la degradación intracelular de proteínas de vida media larga en fibroblastos humanos en ausencia de aminoácidos	71
3. Estudio de la implicación del proteasoma y de otras vías proteolíticas en la degradación de una proteína específica de membrana plasmática: el receptor de LDL	74
3.1 Transfecciones permanentes de células CHO <i>ldlA7</i>	75
3.1.1 Análisis de la expresión del receptor transfectado permanentemente en células CHO <i>ldlA7</i>	77
3.1.2 Análisis de la expresión del receptor de LDL en las células transfectadas establemente por inmunoprecipitación	78
3.1.3 Análisis de la funcionalidad del receptor transfectado por inmunofluorescencia directa asociada a ligando	79
3.2 Estudio de la forma precursora del receptor de LDL	81
3.2.1 Cinética de conversión de la forma precursora del receptor de LDL en receptor maduro	81
3.2.2 Estudio de la vía degradativa de la forma precursora mutada	84
3.3 Estudio de la estabilidad del receptor maduro de LDL con la mutación C358Y	86
3.4 Estudio comparativo de los mecanismos de degradación del receptor maduro silvestre de LDL y de la forma mutante C358Y	88
Discusión	91
1. Localización subcelular de los proteasomas y de sus complejos reguladores en células de mamífero	93
2. Contribución de los proteasomas y de otras vías proteolíticas a la degradación intracelular de proteínas, en fibroblastos humanos en diferentes condiciones de crecimiento	99

2.1	Análisis de diferentes inhibidores de las vías proteolíticas proteasomales y lisosomales	99
2.2	Contribución de las principales vías proteolíticas a la degradación de proteínas de vida media corta	101
2.3	Contribución de las principales vías proteolíticas a la degradación de proteínas de vida media larga	105
3.	Estudio de la implicación del proteasoma y de otras vías proteolíticas en la degradación de una proteína específica de membrana plasmática: el receptor de LDL	108
3.1	Estudio de la forma precursora del receptor de LDL	109
3.2	Estudio de la forma madura del receptor de LDL	111
Conclusiones		115
Material y Métodos		119
1.	Material	121
1.1	Inhibidores de la proteólisis	121
1.2	Isótopos radiactivos	121
1.3	Otros materiales	121
2.	Cultivos celulares	121
3.	Purificación de proteasomas	122
4.	Anticuerpos	122
4.1	Anticuerpos anti-proteasoma	122
4.2	Anticuerpos policlonales anti-receptor de LDL	124
4.3	Otros anticuerpos	124
5.	Aislamiento de fracciones subcelulares de hígado de rata	125
5.1	Aislamiento de núcleos, mitocondrias, microsomas y citosol	125
5.2	Aislamiento del retículo endoplásmico, rugoso y liso y del complejo de Golgi	125
6.	"Western-blot"	126
6.1	Obtención de extractos celulares	126
6.2	Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS e inmunotransferencia	126
7.	Métodos morfológicos	127
7.1.	Técnicas de ME convencional	127
7.2.	Técnicas de fluorescencia	128
7.2.1.	Fluorescencia indirecta	128
7.2.2.	Fluorescencia directa	128
8.	Transfecciones de células de mamífero	129
8.1	Obtención de los plásmidos pCMVLDLR y pCMVC358Y	129
8.2	Transfección permanente de células CHO <i>ldlA7</i>	130
9.	Experimentos de pulso y caza	131
9.1	Estudios de degradación intracelular de proteínas de vida media corta y de vida media larga	131
9.2	Procedimientos para calcular las cinéticas de degradación de proteínas de vida media corta y vida media larga a partir de las cinéticas de proteínas marcadas durante un tiempo breve	132
9.3	Ensayos de pulso y caza con ³⁵ S-Met e inmunoprecipitación en células CHO-hLDLR y CHO-C358Y en cultivo	133
10.	Otros métodos	133

Bibliografía	135
Anexo Publicaciones	155

INTRODUCCIÓN

Los niveles intracelulares de las proteínas se encuentran en un equilibrio dinámico, mantenido gracias a un delicado balance entre los procesos de síntesis y de degradación. La degradación intracelular de proteínas es el conjunto de procesos que producen la hidrólisis de todos los enlaces peptídicos hasta sus aminoácidos constituyentes por la acción de unas enzimas llamadas proteasas y que afecta a todas las proteínas de una célula.

En líneas generales, se sabe que el proceso de degradación intracelular de proteínas ocurre a gran escala y cumple funciones esenciales para la supervivencia celular, implicándose en: i) el control de la división, de la proliferación y de la diferenciación celular, así como de los mecanismos de morfogénesis, envejecimiento y muerte celular tanto por necrosis como por apoptosis; ii) la adaptación de la maquinaria enzimática celular a cambios ambientales; iii) la eliminación de proteínas no funcionales o "erróneas"; iv) el control del tráfico intracelular de proteínas, mediante el procesamiento de sus formas precursoras; v) la comunicación intercelular, mediante la producción de fragmentos proteicos que actúan como hormonas, antígenos o efectores extracelulares; vi) el control hormonal y de otras señalizaciones, mediante la degradación de las proteínas implicadas; vii) la provisión a las células, en situaciones de estrés como en el ayuno, de aminoácidos utilizables como fuente de energía o para la síntesis de proteínas esenciales para la supervivencia celular, etc. (Doherty y Mayer, 1992; Kidd *et al.*, 2000; Brix *et al.*, 2001; Fukuhara *et al.*, 2001; Larbaud *et al.*, 2001 y Malek *et al.*, 2001). Dada la importancia de los procesos controlados por los sistemas de degradación intracelular de proteínas, es obvio que defectos en el funcionamiento de los mismos intervienen en la patogénesis de un gran número de enfermedades.

Todas estas funciones son realizadas por distintos tipos de proteasas situadas en diferentes localizaciones subcelulares. Así, podemos diferenciar claramente aquellos procesos degradativos ubicados en el interior de lisosomas, de los que acontecen en el citosol y en otros orgánulos subcelulares. De esta forma, tradicionalmente se han clasificado las vías de degradación intracelular de proteínas en dos tipos principales; las vías lisosomales y las vías no lisosomales y, dentro de éstas, las más importantes en cuanto a su contribución a la degradación intracelular de las proteínas son los proteasomas.

1. PROTEASOMAS

Los proteasomas son grandes complejos multienzimáticos con actividad proteolítica formados por múltiples subunidades (Kloetzel, 2001; Hendil *et al.*, 2002). El más sencillo de todos es el proteasoma 20S, al que se pueden unir distintos complejos reguladores dando lugar a distintos proteasomas.

1.1 Proteasomas 20S

1.1.1 Proteasoma 20S

El proteasoma 20S es un complejo multienzimático de 700 kDa compuesto por múltiples subunidades cuyas masas moleculares oscilan entre 21 y 34 kDa y con un coeficiente de sedimentación de 20S, por lo que recibe ese nombre. Se encuentra en todas las células

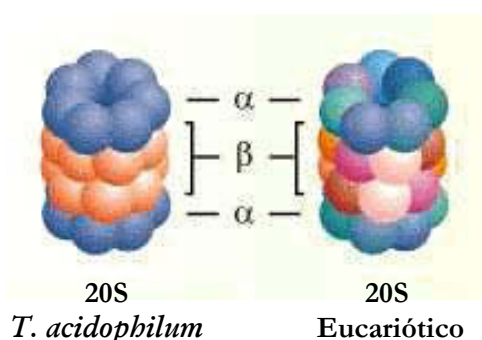


Figura 1. Proteasoma 20S de *Archaea* y eucariótico. Ver explicación en el texto. (Goldberg, 1995).

eucarióticas, desde las levaduras al hombre (Arrigo *et al.*, 1987), y presenta una estructura cuaternaria muy conservada que, al microscopio electrónico (ME), aparece con la forma de un barril compuesto por 4 anillos apilados (Hegerl *et al.*, 1991). Las dimensiones aproximadas del cilindro son: 15 nm de altura y 12 nm de diámetro. El descubrimiento de un complejo homólogo al eucariótico en *Thermoplasma acidophilum* (*Archaea*), pero más sencillo en cuanto a su composición (Baumeister *et al.*, 1988), facilitó mucho el estudio de la estructura del proteasoma 20S. Este complejo en *Archaea*, que presenta la misma forma y dimensiones que el proteasoma eucariótico, está formado por múltiples copias de dos únicas subunidades, llamadas α y β (de 25.8 y 22.3 kDa de masa molecular, respectivamente). La estequiometría del proteasoma en *Archaea* es $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$, situándose las subunidades α (Figura 1, en azul) en los anillos externos y las β (Figura 1, en rojo) en los internos (Grziwa *et al.*, 1991). Las subunidades descritas en eucariotas, relacionadas evolutivamente pero no idénticas, pueden dividirse en dos grupos

principales α ($\alpha 1$ - $\alpha 7$) y β ($\beta 1$ - $\beta 7$) según presenten homología con las subunidades α o β , respectivamente, del proteasoma de *Thermoplasma acidophilum* (Figura 1, α y β en distintas tonalidades de rojo y azul, respectivamente).

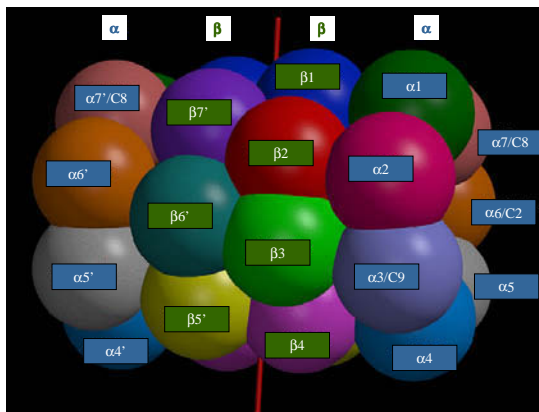


Figura 2. Subunidades del proteasoma 20S eucariótico.

también llamada recientemente actividad similar a la caspasa), básicos (actividad similar a la tripsina) o hidrofóbicos (actividad similar a la quimotripsina), respectivamente (Wilk y Orłowski, 1980, 1983; Orłowski y Wilk, 1981). El proteasoma en *Archaea* sólo posee una actividad catalítica, la llamada actividad similar a la quimotripsina y existen 14 centros activos, uno por cada una de las subunidades β situadas en los dos anillos interiores (Löwe *et al.*, 1995).

En el sitio activo catalítico se encuentra el grupo hidroxilo de la treonina situada en el extremo amino-terminal de las tres subunidades β . Esta treonina caracteriza a los proteasomas como miembros de una nueva familia de hidrolasas con un único residuo activo nucleofílico amino-terminal y que puede ser una treonina, una serina o una cisteína (Oinonen y Rouvinen, 2000). Los inhibidores específicos de las actividades proteolíticas del proteasoma van dirigidos a los centros activos del mismo y algunos se unen covalentemente a las subunidades β (Rock *et al.*, 1994; Fenteany *et al.*, 1995).

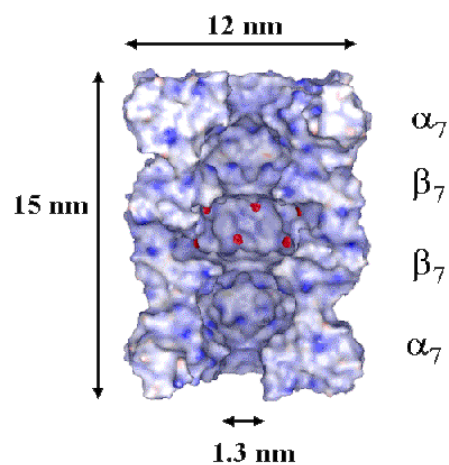


Figura 3. Sección longitudinal del proteasoma y dimensiones del mismo. Los sitios activos están marcados en rojo.

En el centro de los anillos existe un poro de aproximadamente 1.3 nm (Figura 3) por el que los sustratos acceden a la cavidad catalítica, formada por los dos anillos internos que llevan las subunidades β , para ser degradados. Por tanto, los sitios hidrolíticos en el proteasoma están topológicamente aislados del citosol (al igual que ocurre, por ejemplo, con las catepsinas lisosomales, que están separadas de sus sustratos por la membrana del lisosoma). Según este esquema, y debido a sus dimensiones, el proteasoma 20S sólo sería capaz de degradar proteínas o péptidos que estén totalmente desplegados, pero no sería capaz de degradar proteínas plegadas en su conformación nativa ni tampoco proteínas que no estén plegadas pero que contengan algún puente disulfuro. Una evidencia directa de lo anterior la han proporcionado los estudios mediante ME, en los que se muestra que la cadena B de la insulina, que es degradada con facilidad por el proteasoma 20S, no puede serlo cuando se le conjuga covalentemente una partícula de oro coloidal de 2 nm, ya que la partícula de oro no puede pasar a través del poro de 1.3 nm y la proteína no puede acceder al canal proteolítico (Wenzel y Baumeister, 1995). Por ello, el hecho de que sólo las proteínas que no estén plegadas puedan entrar por el orificio que delimitan las subunidades α hace que éstas, junto con otros componentes reguladores que después comentaremos, constituyan una barrera necesaria para prevenir la proteólisis indiscriminada de los componentes celulares.

1.1.2 Inmunoproteasoma

Además de las 14 subunidades homólogas a las de levadura, se han descrito en mamíferos otras 3 subunidades de tipo β , LMP2 (β 1i), LMP7 (β 5i) y MECL-1 (β 2i) (Glynne *et al.*, 1991; Belich *et al.*, 1994; Kristensen *et al.*, 1994), todas ellas inducibles por el γ -interferón. Cuando las tres subunidades con actividad proteolítica, Y (β 1), X (β 5) y Z (β 2), en los dos anillos internos del proteasoma 20S, son sustituidas por estas tres subunidades β , LMP2, LMP7 y MECL-1 respectivamente, que se ensamblan de modo cooperativo, se forma un nuevo complejo 20S llamado inmunoproteasoma (Witt *et al.*, 2000).

Esta modificación en la composición en subunidades del proteasoma 20S conduce a un cambio en las actividades proteolíticas de esta población de proteasomas (Sijts *et al.*, 2000). Así, se obtienen proteasomas que hidrolizan más eficazmente enlaces peptídicos situados detrás de residuos hidrofóbicos y básicos y con menor eficacia los residuos situados detrás de residuos ácidos (Driscoll *et al.*, 1993; Gaczynska *et al.*, 1993, 1994). De esta manera, aunque el total de péptidos producidos no varía, se incrementa el número de péptidos con residuos carboxi-terminales hidrofóbicos o básicos. Precisamente, son estos péptidos los que se transportan mayoritariamente al interior del retículo endoplásmico (RE), donde tienen acceso a las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase I (Shepherd *et al.*, 1993; Kloetzel, 2001). Por tanto, los inmunoproteasomas intervienen probablemente en la formación de péptidos antigénicos para su presentación por el complejo principal de histocompatibilidad de clase I en la mayoría de las células, lo que justifica su nombre (inmunoproteasoma o inmuno-20S). Además, se piensa que el inmunoproteasoma se une sobre todo al complejo PA28 (Hilt y Wolf, 2001).

1.2 Complejos reguladores del proteasoma 20S

1.2.1. Complejo 19S

El complejo regulador 19S (también conocido como PA700) se une en cada extremo del proteasoma 20S (Coux *et al.*, 1996; Strickland *et al.*, 2000) y constituye el proteasoma 26S (Figura 4), un complejo de 2,000 kDa, que tiene como núcleo catalítico el proteasoma 20S. Tanto en la formación del proteasoma 26S como para su estabilidad se requiere ATP (Coux *et al.*, 1996).

El regulador 19S tiene dos componentes, llamados base y tapadera, cada uno formado por varias subunidades (Figura

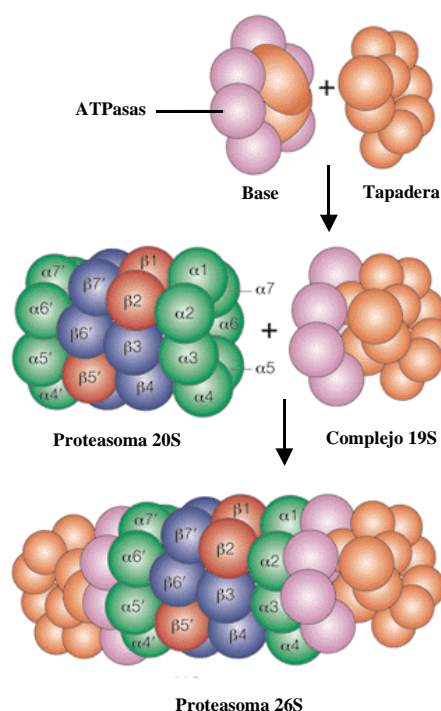


Figura 4. Composición del proteasoma 26S. (Basado en Kloetzel, 2001). El complejo 19S se compone de dos subestructuras, la base y la tapadera. La base está compuesta por 8 subunidades, 6 de ellas con actividad ATPasa (destacadas en morado) y 2 que no tienen esa actividad (señaladas en naranja). La tapadera está formada por 10 subunidades (señaladas en naranja) y que no tienen actividad ATPasa. No se excluye la existencia de subunidades adicionales.

4). La base, compuesta por 6 ATPasas distintas y por dos subunidades que no tienen esa actividad (Glickman *et al.*, 1998), se une al núcleo catalítico 20S. Las subunidades con actividad ATPasa también tienen actividad de tipo chaperona y se cree que ayudan a desplegar los sustratos, canalizándolos al interior del núcleo 20S. De esta manera, controlan el acceso de los sustratos a las proteasas en el interior del proteasoma (Braun *et al.*, 1999; Glickman *et al.*, 1999). La tapadera está formada por unas diez subunidades ninguna de las cuales tiene actividad ATPasa y cuya función se desconoce.

El proteasoma 26S interviene en la degradación de proteínas conjugadas a poliubiquitinas (Walters *et al.*, 2002). Se ha identificado la subunidad S5a, una subunidad no ATPasa de la tapadera del regulador 19S, como la subunidad que reconoce e interacciona con las cadenas de poliubiquitina (Deveraux *et al.*, 1994) y es posible, sin embargo, que otras subunidades, como S1 y S2, también puedan cumplir esa función.

Los proteasomas se cree que degradan sobre todo proteínas sintetizadas con errores o alteradas post-traduccionalmente (Oberdorf *et al.*, 2001) y proteínas de vida media corta cuya rápida desaparición es necesaria para el control del metabolismo celular, como ciclinas (Glutzer *et al.*, 1991; Bartek y Lukas, 2001; Ceccarelli y Mann, 2001; Verma *et al.*, 2001), supresores tumorales y productos de proto-oncogenes (Ciechanover *et al.*, 1994; Piccinini *et al.*, 2001; Prince *et al.*, 2002), otros factores de transcripción (Palombella *et al.*, 1994; Hungness *et al.*, 2002), proteínas musculares en estados de ayuno o enfermedad (Wing *et al.*, 1995; Attaix *et al.*, 1999; Combaret *et al.*, 2002) y otras muchas que son degradadas por la vía dependiente de ubiquitina.

Los proteasomas también degradan proteínas por un mecanismo independiente de ubiquitina, como se demostró inicialmente con la ornitina descarboxilasa, enzima clave en la síntesis de poliaminas, tanto en mamíferos (Murakami *et al.*, 1992) como en *Saccharomyces cerevisiae* (Gandre *et al.*, 2002), pero que también incluye otras proteínas (Bossis *et al.*, 2003).

1.2.2 Complejo 11S

Este proteasoma está compuesto por el proteasoma 20S, que de nuevo constituye el núcleo catalítico, unido al complejo regulador 11S (llamado también PA28 o REG). El complejo 11S consta de dos subunidades de aproximadamente 30 kDa inducidas por γ -interferón, PA28 α y PA28 β . Estas dos subunidades presentan una homología del 50% pero

también muestran una gran similitud (30-40%) con una proteína nuclear, el antígeno Ki o PA28 γ , de función desconocida. Estas dos subunidades, PA28 α y PA28 β , forman, al parecer, un complejo $\alpha_3\beta_4$ (Realini *et al.*, 1994; Knowlton *et al.*, 1997) que se une sin requerimiento de ATP, a los anillos externos α del proteasoma 20S. El hecho de que la expresión de ambas subunidades esté controlada por el γ -interferón, junto a otras observaciones, sugiere que la función *in vivo* del proteasoma-PA28 esté relacionada con el procesamiento de antígenos (Realini *et al.*, 1994) y con el inmunoproteasoma. La unión de PA28 al núcleo 20S activa al proteasoma e incrementa la afinidad por el sustrato, aumentando la captación del sustrato o la liberación de los péptidos producto pero sin modificar la actividad enzimática del complejo (Stohwasser *et al.*, 2000).

1.2.3 Proteasomas mixtos PA28/19S

El regulador 19S y el PA28 pueden también unirse a la vez, cada uno por un extremo, al proteasoma 20S, generando un proteasoma mixto o híbrido (11S-20S-19S) cuya función se desconoce aún (Hilt y Wolf, 2001).

2. SISTEMA LISOSOMAL

Junto a los proteasomas, los lisosomas constituyen el otro gran sistema de degradación intracelular de proteínas. Los lisosomas aparecen, sobre todo, como responsables de la degradación de proteínas endocitadas y de proteínas intracelulares bajo situaciones catabólicas extremas (por ejemplo ausencia de suero en células en cultivo, ayuno en animales, etc.). Los lisosomas contienen diferentes enzimas hidrolíticas englobadas en una o más membranas (Mullins y Bonifacino, 2001), que incluyen nucleasas, glicosidasas, lipasas, fosfolipasas, fosfatasas, sulfatasas y más de 20 proteasas diferentes (Bohley y Seglen, 1992) con un patrón variable de expresión en función del tipo de tejido y del tipo celular y cuya actividad está sujeta a una regulación hormonal y dietética (Inubushi et al., 1996). La mayoría de proteasas lisosomales se denominan catépsinas y pueden ser exopeptidasas, endopeptidasas o mixtas, tienen un pH óptimo ácido (entre 3.5-6.0) y una amplia especificidad de sustrato. Las principales proteasas lisosomales son cisteín-proteasas, pero los lisosomas también contienen niveles elevados de una aspártico-proteasa, la catépsina D, muy activa a pH ácido. Estos orgánulos mantienen, mediante una bomba de protones localizada en su membrana, un medio interno ácido con un pH entre 4.5-5.0, óptimo para la actividad de la mayoría de hidrolasas lisosomales. La membrana lisosomal forma una barrera para las moléculas con masas moleculares de 200 Da o superiores y posee sistemas transportadores para moléculas pequeñas como aminoácidos o monosacáridos (Pisoni y Thoene, 1991). Uno de estos sistemas es el transportador específico de cisteína, que facilita la entrada y salida del lisosoma de este aminoácido, necesario para mantener la actividad de cisteín-proteasas y para reducir los puentes disulfuro en los sustratos que van a ser degradados (Pisoni y Velilla, 1995).

Como se ha dicho antes, los lisosomas son responsables de la degradación de proteínas extracelulares que son endocitadas y de proteínas intracelulares bajo situaciones catabólicas extremas (por ejemplo, ausencia de suero en células en cultivo, ayuno en animales, etc.).

Las proteínas que son degradadas por los lisosomas pueden llegar a estos orgánulos por mecanismos diferentes (ver Figura 5), que podemos agrupar en dos grandes grupos: macroautofágicos y no macroautofágicos.

2.1 Macroautofagia

La **Macroautofagia** consiste en la degradación de grandes porciones de citoplasma, conteniendo incluso orgánulos enteros, en vacuolas autofágicas cuya membrana o membranas se forma/n a partir de una sácula del RE carente de ribosomas (Dunn, 1990) o *de novo* (Ohsumi, 2001). Estas vacuolas se han identificado en condiciones fisiológicas, pero sobre todo en condiciones de ayuno en la casi totalidad de los tipos celulares examinados (Pfeifer, 1987; Kim y Klionsky, 2000). Los procesos macroautofágicos se consideran responsables de la mayoría de la degradación de las proteínas celulares que ocurre por las vías lisosomales (Mortimore *et al.*, 1988).

El proceso de macroautofagia está muy conservado evolutivamente (Kim y Klionsky, 2000) y está altamente regulado por varias proteínas quinasas, fosfatasas y guanosin-trifosfatasas (GTPasas). Además, la macroautofagia requiere, para formar las vacuolas autofágicas, de un sistema de conjugación de proteínas parecido al de la ubiquitina y también precisa un complejo proteico que dirige el acoplamiento de las membranas y la fusión con el lisosoma (Klionsky y Emr, 2000; Suzuki *et al.*, 2001). En general, se considera este mecanismo como una degradación no selectiva, aunque en algunas situaciones determinados orgánulos son degradados selectivamente, probablemente por encontrarse en exceso o no ser ya necesarios. El caso más estudiado es la degradación de peroxisomas en levadura, donde estos orgánulos son secuestrados selectivamente por esta vía o por otra (microautofagia) según las condiciones nutricionales en las que se encuentre la levadura (Tuttle y Dunn, 1995; Kim y Klionsky, 2000).

2.2 No Macroautofagia

La **Heterofagia** es el proceso por el que se degradan proteínas extracelulares que entran en la célula por endocitosis de fase fluida o por endocitosis mediada por receptor. En esta última se originan vesículas endocíticas formadas por membrana plasmática y recubiertas de clatrina, adaptina y otras proteínas. Estas vesículas se fusionan con endosomas tempranos en los que, debido a la acción de una bomba de protones localizada en la membrana del endosoma, se produce un descenso de pH que implica un cambio de conformación en el receptor, disociándose éste del ligando. Muchos receptores se reciclan a la superficie mientras que los ligandos y el resto de proteínas de membrana plasmática pasan a formar parte de los

llamados endosomas tardíos, en los que el pH desciende aún más, debido a cambios en la actividad de la misma bomba de protones. Estos endosomas tardíos, finalmente, se fusionan bien con lisosomas primarios, que son aquellos que no han intervenido aún en procesos degradativos pero presentan toda su dotación enzimática, o con otros lisosomas. De esta forma, las proteínas exógenas o algunas de la membrana plasmática que no se reciclan son totalmente degradadas. Mientras que la mayor parte de los receptores son reciclados a la membrana plasmática, otras proteínas de membrana, sobre todo receptores de factores de crecimiento y otras proteínas envueltas en transducción de señales, siguen la misma vía que los ligandos y se degradan en los lisosomas. Se desconoce todavía por qué unas proteínas de membrana plasmática se degradan siguiendo esta vía y otras no. Es probable que exista algún tipo de señal en las colas citoplasmáticas de estas proteínas que las dirija hacia una determinada ruta degradativa. En este contexto la modificación por ubiquitina parece tener un papel importante en la endocitosis mediada por receptor (Mori *et al.*, 1992). Por ejemplo, el receptor β del factor de crecimiento derivado de plaquetas, tras su unión al ligando, se ubiquitila y es transportado a los lisosomas (Löw *et al.*, 1995). De manera similar, otras muchas proteínas de membrana son eliminadas de modo regulado por internalización en la vía endocítica. Así, en células de mamífero, varios canales iónicos y varios receptores de distintas vías de transducción de señales siguen una internalización regulada (Levkowitz *et al.*, 1999; Staub *et al.*, 2000). Estas proteínas son ubiquitiladas en sus dominios citosólicos en respuesta a una señal extracelular y es esa ubiquitilación la que regula su destino lisosomal durante el transporte endocítico. En estos casos la monoubiquitilación es suficiente para desencadenar la internalización de esas proteínas de membrana en vesículas endocíticas primarias (Nakatsu *et al.*, 2000) y se conocen algunas proteínas ligasas de ubiquitina que modifican a algunas proteínas de membrana plasmática (Joazeiro *et al.*, 1999; Rotin *et al.*, 2000).

La **Crinofagia** es el proceso por el cual las proteínas de secreción sintetizadas en exceso son conducidas a los lisosomas para su degradación, cuando disminuye la demanda de estas proteínas (Smith y Farquhar, 1966; Glaumann, 1989). Por tanto, la crinofagia permite a las células adaptar sus procesos de secreción a las variaciones en los requerimientos metabólicos (Schnell-Landstrom *et al.*, 1991). En la crinofagia, las vesículas de secreción que llevan estas proteínas se fusionan con lisosomas primarios o secundarios, en vez de con la membrana plasmática, y el contenido de las vesículas de secreción es digerido (Glaumann,

1989). Un caso particular de la crinofagia es la llamada "conversión directa del RE en lisosomas", en la que una cisterna del RE conteniendo proteínas de secreción puede ser convertida directamente en lisosomas. En este caso, el RE pierde los ribosomas y adquiere proteínas de membrana lisosomal mediante un proceso gradual en el que, probablemente, se producen fusiones de ese RE con lisosomas primarios o secundarios (Orci *et al.*, 1984; Noda y Farquhar, 1992; Knecht *et al.*, 1998).

La **Microautofagia** es un proceso que supone la captura de pequeñas porciones de citoplasma, a nivel de moléculas individuales o de pequeños grupos de moléculas, por parte de los lisosomas mediante diversas modificaciones (túbulos, vesículas, etc.) de la membrana lisosomal (Dunn, 1990; Knecht *et al.*, 1998).

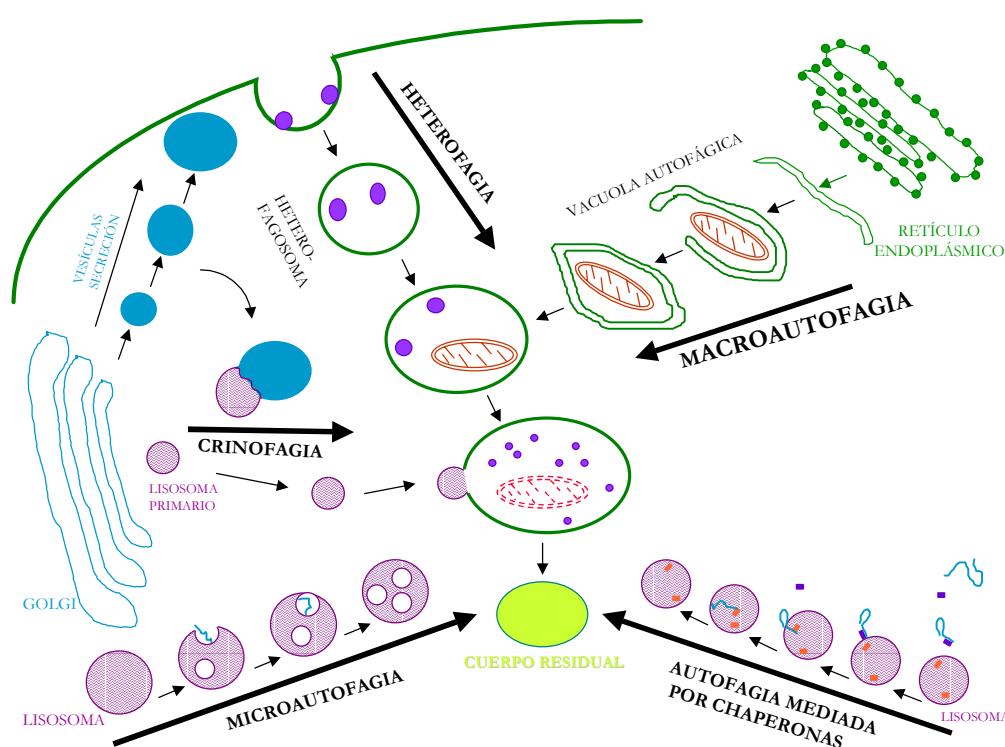


Figura 5. Principales vías degradativas lisosomales. Ver explicación en el texto.

Por último se ha descrito un mecanismo selectivo de entrada de proteínas desde el citosol hasta el interior de lisosomas para ser degradadas conocido como **Autofagia mediada por chaperonas**. Este proceso fue descrito inicialmente para una proteína, la ribonucleasa A

de páncreas bovino (RNasa A), microinyectada a un cultivo de fibroblastos confluentes en ausencia de suero (Dice, 1990). Esta vía selectiva se ha demostrado que es también operativa en hígado de rata, especialmente tras ayuno prolongado (Cuervo *et al.*, 1995a) y para la selectividad de este proceso se ha propuesto que las proteínas presenten la secuencia KFERQ (Lys-Phe-Glu-Arg-Gln) o una secuencia homóloga (Dice, 1990). Su transporte al interior del lisosoma depende de la unión a una proteína constitutiva de choque térmico de 73 kDa (hsc73) y de ATP. En este transporte también intervendría una glicoproteína de la membrana lisosomal de 96 kDa, Lamp-2a, que actuaría como un receptor de estas proteínas (Cuervo y Dice, 1998) y una hsc73 intralisosomal (Agarraberes *et al.*, 1997; Cuervo *et al.*, 1997). El mecanismo de entrada de las proteínas a través de la membrana lisosomal por esta vía se produce mientras la proteína mantiene una conformación desplegada (Salvador *et al.*, 2000) y en él intervienen otras proteínas de tipo chaperona, como hsp90, hsp40, Hop, Hip y BAG-1 situadas en la membrana del lisosoma (Agarraberes y Dice, 2001).

3. OTRAS VÍAS NO PROTEASOMALES Y NO LISOSOMALES

Las **Calpaínas** representan una superfamilia de cisteín-proteasas intracelulares no lisosomales, relacionadas estructuralmente y activadas por calcio. Estas proteasas coexisten en las células de mamífero con un inhibidor endógeno específico, la calpastatina, por lo que se piensa que este inhibidor tiene una función en la regulación de la actividad de las calpaínas (Suzuki *et al.*, 1995; Tompa *et al.*, 2002). Respecto a las funciones que desempeñan las calpaínas en la célula se les atribuye un papel, entre otros, en vías de transducción de señales, en procesos de apoptosis, en la regulación del ciclo celular y en la reorganización del citoesqueleto (Molinari y Carafoli, 1997; Sorimachi *et al.*, 1997; Carafoli y Molinari, 1998; Ono *et al.*, 1998; Glading *et al.*, 2002).

Las **Caspasas** son otra familia de cisteín-proteasas, que hidrolizan sustratos proteicos rompiendo el enlace peptídico por detrás de residuos específicos de aspartato (Alnemri *et al.*, 1996; Leist y Jaattela, 2001; Truong-Tran *et al.*, 2001). La localización de las caspasas suele ser citosólica, aunque también se han observado en el interior de mitocondrias, retículo endoplásmico y núcleo. La función principal de las caspasas está relacionada con la apoptosis (Los *et al.*, 2002; Uchida *et al.*, 2002).

Otro sistema proteolítico es el **mitocondrial** que interviene en la degradación dependiente de ATP de polipéptidos asociados a la membrana interna mitocondrial. Está compuesto por dos complejos homólogos situados en la membrana interna, las proteasas m-AAA e i-AAA, que exponen sus sitios catalíticos en superficies opuestas de esta membrana (Leonhard *et al.*, 1996; Langer *et al.*, 2001). Estas dos proteasas ejercen funciones cruciales para la biogénesis mitocondrial y su actividad está regulada por otras proteínas llamadas prohibitinas (Steglich *et al.*, 1999; Nijtmans *et al.*, 2000; Langer *et al.*, 2001).

Existe otro grupo de proteasas implicadas en procesamiento, por ejemplo de las proteínas precursoras que son importadas a la mitocondria con una secuencia señal (Isaya *et al.*, 1994). La peptidasa de procesamiento mitocondrial (MPP) localizada en la matriz mitocondrial que corta toda o parte de la presecuencia (Deng *et al.*, 2001), la peptidasa intermedia mitocondrial (MIP) que procesa las formas precursoras que han cortado las MPP convirtiéndolas en sus formas maduras (Chew *et al.*, 2000) y una proteasa de membrana interna orientada hacia el espacio intermembrana que actúa sobre intermediarios dirigidos a este espacio (Jan *et al.*, 2000). Las proteasas implicadas en procesamiento hidrolizan solo uno o unos pocos enlaces peptídicos, aunque se supone que las secuencias señal, separadas de la proteína madura, son inmediatamente degradadas.

Existen además, **otras proteasas citosólicas** como la insulinasasa (Rawlings y Barrett, 1993), la neurolisina (Brown *et al.*, 2001), etc. Sin embargo, se piensa que el papel de esas proteasas en la degradación general de las proteínas intracelulares es muy limitado desde el punto de vista de su importancia cuantitativa.

4. ESTUDIO DE LA DEGRADACIÓN DEL RECEPTOR DE LAS LIPOPROTEÍNAS DE BAJA DENSIDAD (LDL), UNA PROTEÍNA DE RELEVANCIA FISIOLÓGICA Y PATOLÓGICA

La **arteriosclerosis** está considerada como la primera causa de muerte en las sociedades occidentales. El término arteriosclerosis es el nombre genérico que reciben diversas enfermedades que implican un engrosamiento de la pared arterial, con la consecuente pérdida de elasticidad. Dentro de este grupo de enfermedades se incluye la **aterosclerosis**, que se caracteriza por la aparición de una lesión distintiva, la placa de ateroma. Se ha determinado que el riesgo de padecer aterosclerosis se incrementa cuanto mayor es la concentración de colesterol asociado a las lipoproteínas de baja densidad (LDL) de la sangre (Krieger, 1998). El colesterol se encuentra en todas las células del organismo como componente estructural de las membranas celulares, forma parte esencial de hormonas, como las sexuales (andrógenos y estrógenos) y es precursor de los ácidos biliares. Las células presentan una regulación estricta de los niveles intracelulares de colesterol libre, manteniéndose un equilibrio entre el colesterol que captan del exterior y la síntesis endógena. El aporte exógeno de colesterol se realiza través de unas partículas que lo transportan por el plasma, denominadas **lipoproteínas** (Lestavel y Fruchart, 1994).

Las lipoproteínas de baja densidad constituyen el transportador de colesterol más importante de la sangre en el ser humano. La partícula consta de un núcleo central, altamente hidrofóbico, formado por moléculas de colesterol esterificado, que está rodeado por una capa de fosfolípidos y colesterol sin esterificar y una apolipoproteína, la apo B-100, asociada a esta cubierta. La función principal de esta lipoproteína es el transporte del colesterol a los tejidos periféricos donde será asimilado por las células, regulando, a su vez, su propia síntesis endógena. Los órganos en que tiene lugar preferentemente la síntesis endógena de colesterol son el hígado y el intestino. En el resto de células del organismo la fuente principal de colesterol procede de las LDL.

Estas lipoproteínas experimentan un transporte al interior celular mediado por un receptor específico, el **receptor de LDL**. La regulación de la entrada de LDL en la célula viene determinada por el nivel de receptor, ya que la transcripción de su ARN mensajero también depende de elementos regulados por esteroides (Brown y Goldstein, 1997, Shimomura *et al.*,

1997), inhibiéndose cuando el colesterol se encuentra dentro de la célula en elevadas concentraciones. Por tanto, el receptor de LDL desempeña un papel clave en el metabolismo de las lipoproteínas y en la homeostasis del colesterol, ya que es el encargado de aportar colesterol a las células y de controlar sus niveles plasmáticos, eliminando del torrente circulatorio las LDL.

4.1 Estructura del receptor de LDL

La forma madura del receptor de LDL es una glicoproteína de 839 aminoácidos que se sitúa en la membrana plasmática. El gen del receptor de LDL se encuentra localizado en el extremo del brazo corto del cromosoma 19 y ocupa un total de 45 kb, estando formado por 18 exones y 17 intrones. Basándonos en su composición de aminoácidos y en su estructuración génica en exones, se pueden diferenciar 5 dominios independientes en el receptor de LDL (Figura 6). A estos dominios se les asignan funciones distintas, siendo todas ellas, a su vez, fundamentales para la completa operatividad del receptor.

El primer dominio estructural está formado por los 292 aminoácidos del extremo N-terminal codificados por los exones de 2-6. El exón 1 codifica una región corta no traducida y un péptido señal de 21 aminoácidos que es proteolizado durante su translocación al interior del retículo endoplásmico que ocurre inmediatamente tras su síntesis. Este primer dominio está formado por 7 repeticiones de 40 aminoácidos y es el responsable de la unión de la LDL. Presenta 42 residuos de cisteína (6 por repetición) que conforman un entramado de puentes disulfuro que confiere a este dominio una gran estabilidad. La unión de LDL está mediada por la interacción entre regiones cargadas negativamente (Asp-X-Ser-Asp-Glu), al final de cada repetición, con regiones que presentan cargas positivas en la apo B-100. Del estudio por mutagénesis dirigida se deduce que las repeticiones 2 a la 7 (Figura 6) son necesarias para que se dé la unión de la LDL en condiciones óptimas (Esser *et al.*, 1988). Los iones Ca^{2+} son fundamentales para la integridad estructural de este dominio, por lo que su presencia es necesaria para que se produzca la unión con las LDL (Brown *et al.*, 1997, Atkins *et al.*, 1998).

El segundo dominio, codificado por los exones 7-14, está formado por 400 residuos de aminoácidos, presenta un 33% de homología con el dominio extracelular del precursor del factor de crecimiento epidérmico humano (EGF) y posee dos sitios potenciales de N-glicosilación. Este dominio es necesario para la disociación de la LDL en los endosomas al

disminuir el pH y para el subsiguiente reciclado del receptor a la membrana plasmática, sin que éste alcance los lisosomas y se degrade. Este dominio está flanqueado por 3 repeticiones de unos 40 aminoácidos, denominadas A, B y C. Las dos primeras se encuentran situadas a continuación del dominio de unión de LDL y son fundamentales para que transcurra dicha unión. A este dominio se le adjudica también una función estructural, ya que se encargaría de orientar el dominio de unión para que pudiera interactuar con las LDL.

El tercer dominio es codificado por el exón 15 y consta de 58 residuos de aminoácidos enriquecidos en residuos de Ser y Thr, muchos de los cuales se *O*-glicosilan. La función de este dominio no está perfectamente determinada, pero parece proporcionar estabilidad al receptor, ya que se ha observado que aquellos mutantes que son defectivos en *N* y *O*-glicosilación son degradados rápidamente antes de la maduración del receptor (Henderson *et al.*, 1988).

El cuarto dominio consiste en la región transmembrana del receptor. Se compone de 22 residuos de aminoácidos hidrofóbicos, codificados por el exón 16 y parte de la región 5' del exón 17, que anclan la proteína a la membrana plasmática. Determinados mutantes en esta región son secretados directamente al medio extracelular.

El dominio citosólico del receptor de LDL consta de 50 aminoácidos y lo forma el segmento C-terminal de la proteína que es codificado por el resto del exón 17 y parte del 18. Este dominio contiene las secuencias señal de reconocimiento de adaptinas, proteínas de

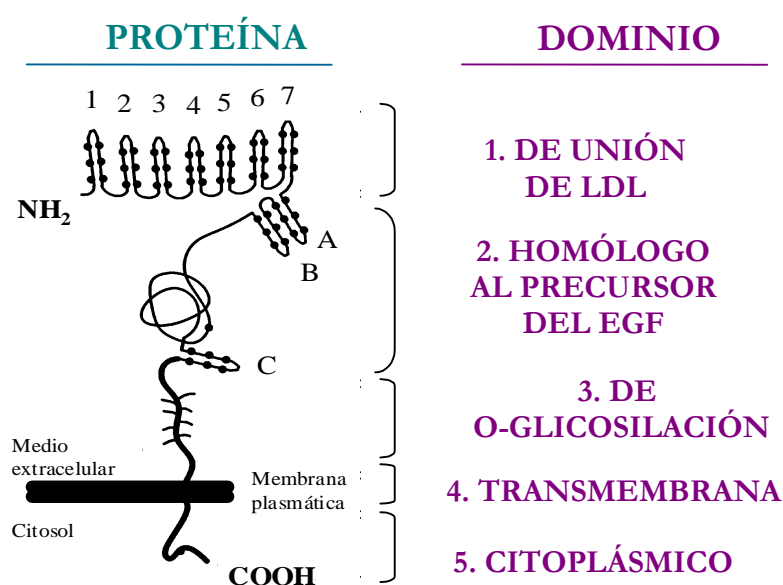


Figura 6. Dominios estructurales del receptor de LDL. Residuo de cisteína (●). Adaptado de Hobbs *et al.*, 1990.

ensamblaje de las vesículas revestidas. Estas adaptinas promueven la interacción de los hoyos que se forman en la membrana plasmática con la clatrina, formándose los hoyos revestidos y produciéndose la endocitosis del receptor (Chen *et al.*, 1990). El resto del exón 18 transcribe la región 3' del ARN mensajero que no se traduce (unas 2.6 kb).

4.2 Metabolismo del receptor de LDL

El receptor de LDL se sintetiza en ribosomas unidos a la membrana del retículo endoplásmico, a cuyo interior se transloca perdiendo su secuencia señal. En este estadio, el receptor presenta una movilidad electroforética correspondiente a una proteína de una masa relativa de unos 120 kDa (Lestavel y Fruchart, 1994). Transcurridos 15-30 minutos de su síntesis, el precursor alcanza su forma madura en el aparato de Golgi, presentando una masa molecular aparente de 160 kDa. Este cambio en la movilidad es debido a la elongación de las cadenas O-glicosiladas y a cambios conformacionales que implican un descenso de la movilidad electroforética. Aproximadamente a los 45 minutos de su síntesis, el receptor aparece ya en la membrana plasmática, formando agrupaciones en regiones concretas de ésta, donde cada molécula del receptor podrá unir una partícula de LDL mediante su interacción con la apo B-100. En 3-5 minutos, estas agrupaciones forman primero un hoyo y después una vesícula revestida de clatrina. Rápidamente, el revestimiento de clatrina se disocia de estas vesículas, que se fusionan creando endosomas. Debido al funcionamiento de una bomba de protones en la membrana de los endosomas, disminuye el pH en el interior de los mismos, facilitándose así la disociación de las LDL del receptor. Los receptores son normalmente conducidos nuevamente a la superficie celular donde pueden repetir el mismo proceso cada 10 o 20 minutos. Debido a la gran estabilidad estructural de su centro de unión, este ciclo lo repiten hasta 150 veces sin perder funcionalidad. Cuando se disocian las LDL del receptor, el endosoma se fusiona con lisosomas, donde la partícula de LDL se degrada totalmente por la acción de proteasas y lipasas, originándose aminoácidos, ácidos grasos y colesterol libre.

A pesar de lo mucho que se sabe acerca de la síntesis, procesamiento y función del receptor de LDL, se conoce poco sobre los mecanismos responsables de la degradación del mismo. Se sabe por experimentos de pulso y caza con ³⁵S-Met, que la vida media del receptor en fibroblastos humanos es de unas 11-12 horas (Casciola *et al.*, 1989, Grant *et al.*, 1990, Shite *et al.*, 1990, Hare, 1990) y que esa vida media no se ve afectada por inhibidores de la degradación

lisosomal de proteínas. Por ello, es probable que los proteasomas, la principal vía degradativa no lisosomal, puedan degradar éste.

4.3 Mutaciones en el gen del receptor de LDL

Mutaciones en el gen del receptor de LDL (Goldstein *et al.*, 1995) son causa de una enfermedad autosómica dominante la Hipercolesterolemia Familiar (HF) que se caracteriza clínicamente por la presencia de elevadas concentraciones de colesterol asociado a LDL en la sangre. La HF fue la primera enfermedad genética reconocida como causante de infarto de miocardio, y sigue siendo el ejemplo ilustrativo más convincente de la relación existente entre los niveles altos de colesterol y la aterosclerosis coronaria. Su elevada frecuencia de aparición la coloca entre las enfermedades monogénicas más comunes de los humanos. Los individuos heterocigotos para HF se presentan en la población con una frecuencia de 1/500, mientras que los homocigotos lo hacen con una prevalencia de 1 por cada millón de individuos. Las mutaciones que afectan al gen del receptor de LDL se pueden dividir en 5 clases, en función del efecto fenotípico que ocasionan en la proteína (Figura 7). Esta clasificación se ha efectuado en base a los estudios realizados en fibroblastos obtenidos a partir de individuos enfermos de HF.

Las mutaciones Clase 1 se caracterizan por no producir ningún tipo de receptor de LDL (mutantes de síntesis) que sea inmunoprecipitable por anticuerpos dirigidos contra el mismo. Los fibroblastos clasificados de esta forma presentan una capacidad de unión, internalización y degradación de LDL marcadas con ^{125}I de un 2% o menos que la que presentan los fibroblastos normales. Estas mutaciones suelen deberse, fundamentalmente, a la eliminación del promotor, a grandes deleciones, a mutaciones en las regiones de procesamiento o a mutaciones que provocan un cambio en la pauta de lectura en el gen del receptor de LDL.

Las mutaciones Clase 2 presentan un retraso en el transporte del receptor de LDL al complejo de Golgi y el procesamiento de la forma precursora del receptor de LDL a la forma madura (mutantes de transporte). Estas mutaciones afectan habitualmente a los dos primeros dominios estructurales de la proteína (Figura 6) y suelen ser el resultado de cambios puntuales en algún aminoácido que implican un mal plegamiento de la proteína. Si se bloquea completamente el transporte del receptor fuera del retículo, la mutación se define como de

Clase 2A, mientras que si este transporte sólo está dificultado, apareciendo receptor de LDL en la superficie celular, hablaremos de mutantes de Clase 2B.

Las mutaciones Clase 3 originan receptores que aparecen en la membrana plasmática pero que unen deficientemente las LDL (mutantes de unión). Muchos de los mutantes Clase 2B son también de Clase 3, ya que producen cambios conformacionales en la estructura de la proteína que afectan a la unión de LDL. Las mutaciones afectan, principalmente, al dominio de unión del receptor de LDL, aunque se han descrito algunos ejemplos de mutaciones que afectan al dominio homólogo al precursor del EGF.

Las mutaciones Clase 4 producen receptores que no son capaces de internalizar las LDL unidas (mutantes de internalización). Estas mutaciones (Figura 7) pueden implicar al dominio citoplásmico del receptor (Clase 4A) o al dominio transmembrana (Clase 4B). Las mutaciones de Clase 4A presentan un receptor que no se asocia a los hoyos revestidos de clatrina, apareciendo disperso por la membrana plasmática, mientras que las de Clase 4B son deleciones que implican los dos dominios, por lo que la mayor parte de la proteína es secretada al exterior de la célula.

Por último, la Clase 5 corresponde a las mutaciones de reciclado. La proteína producida es capaz de unir e internalizar LDL, pero no de disociarse en el ambiente ácido de los endosomas, y acaba degradándose a mayor velocidad que el receptor normal. Estas mutaciones afectan al dominio de homología con el precursor del EGF (Figura 6). El fenotipo puede ser confundido con el de las mutaciones de Clase 3, pues produce un efecto semejante en cuanto a la cantidad de LDL unida e internalizada por la célula.

Una de las mutaciones más frecuentes en población española (5%), se encuentra localizada en el segundo dominio del receptor de LDL y cambia un residuo de cisteína por uno de tirosina (C358Y) y los mecanismos de su degradación han sido objeto de estudio en esta Tesis Doctoral.

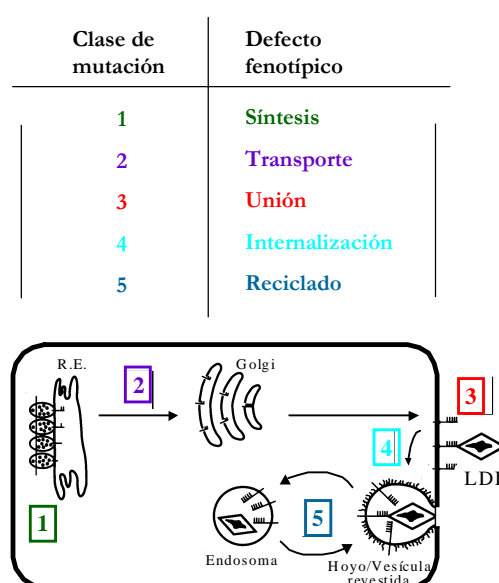


Figura 7. Clasificación de las mutaciones del receptor de LDL en función del efecto fenotípico sobre la proteína. Adaptada de Goldstein *et al.*, 1995.

OBJETIVOS

El objetivo general de nuestro laboratorio es la comprensión de los mecanismos moleculares implicados en la degradación intracelular de proteínas en organismos superiores, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas.

Las vías de degradación intracelular de proteínas, son numerosas y diferentes según la proteína, célula y situación metabólica. El proteasoma se considera una de las principales vías implicadas en estos procesos y esta Tesis Doctoral se centra en averiguar algunos aspectos, todavía poco claros, en relación con esta vía proteolítica. En concreto, aquí se han planteado los siguientes objetivos:

Primer objetivo: investigar la posible existencia de poblaciones de proteasomas, en diversas localizaciones celulares que difieran en su composición en subunidades.

Segundo objetivo: determinar en cultivos celulares, en diferentes condiciones de crecimiento, la contribución de los proteasomas y de otras vías proteolíticas a la degradación general de proteínas intracelulares.

Tercer objetivo: analizar el papel de los proteasomas en la degradación de una proteína específica de membrana plasmática, el receptor de LDL, y estudiar si una de las mutaciones más frecuente en población española, que produce Hipercolesterolemia Familiar (HF), afecta a las vías degradativas de este receptor.

RESULTADOS

1. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LOS PROTEASOMAS Y DE SUS COMPLEJOS REGULADORES EN CÉLULAS DE MAMÍFERO

El proteasoma 20S en células eucarióticas está constituido por 14 subunidades distintas distribuidas en 4 anillos apilados formando un cilindro hueco (ver Figura 1 en la Introducción). Cada anillo consta de 7 subunidades y éstas son de dos tipos: las β , que forman los dos anillos internos y las α , que forman los dos anillos externos. En los proteasomas de levadura existen dos copias (una por anillo) de cada una de las 14 subunidades proteasomales. Sin embargo, en células animales, además de las 14 subunidades homólogas a las de levaduras, se han encontrado otras 3 subunidades del tipo β : LMP2, LMP7 y MECL-1, cuya expresión es inducida por γ -interferón. La existencia de estas tres subunidades da lugar a dos subpoblaciones de proteasomas 20S con diferente composición en subunidades y con distinta función: los proteasomas propiamente dichos y los inmunoproteasomas. Resultados anteriores en nuestro laboratorio, demostraron por inmuno-oro en microscopía electrónica que los proteasomas 20S están presentes en el núcleo, en el citoplasma y asociados a la cara citosólica de la membrana del retículo endoplásmico (Knecht *et al.*, 1991; Rivett *et al.*, 1992). Por tanto, parece razonable pensar que las subpoblaciones anteriores de proteasomas, u otras que resultan de la asociación de estos proteasomas con diferentes complejos reguladores (ver Introducción), pudieran localizarse en diferentes lugares de la célula, ya que la función que realizan debe ser distinta. Por ello, decidimos estudiar la naturaleza de los proteasomas localizados en los distintos compartimientos subcelulares de hígado de rata, investigando la composición de los mismos y de sus complejos reguladores en algunas de sus subunidades.

1.1 Niveles de proteasomas en las fracciones nuclear, mitocondrial, microsomal y citosólica de hígado de rata, detectados por inmunotransferencia

La Figura 1 muestra el análisis por inmunotransferencia, utilizando un anticuerpo policlonal anti-proteasoma 20S (#617), de cuatro fracciones diferentes (núcleos, mitocondrias, microsomas y citosol) aisladas de hígado de ratas sometidas a ayuno durante 20 h. Los proteasomas aparecían claramente asociados a tres de las fracciones analizadas (núcleos,

microsomos y citosol) (Figura 1A), confirmando resultados anteriores (Knecht *et al.*, 1991; Rivett *et al.*, 1992).

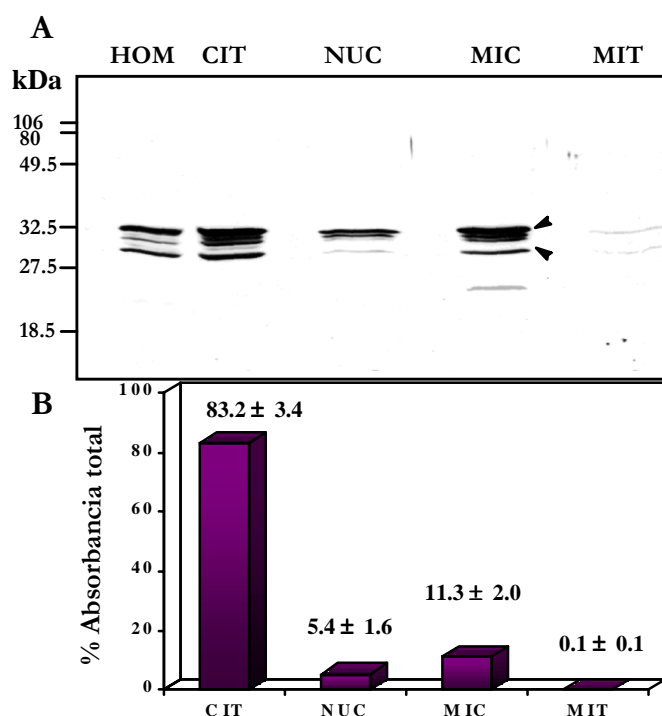


Figura 1. Inmunolocalización de proteasomas en varias fracciones aisladas a partir de hígado de ratas, sometidas a ayuno durante 20 h. (A) Las proteínas de las diversas fracciones (25 μ g de proteína de homogenado (HOM) y citosol (CIT) y 100 μ g de núcleos (NUC), microsomas (MIC) y mitocondrias (MIT) fueron separadas en un gel de poliacrilamida-SDS y sometidas a inmunotransferencia y detección con un anticuerpo anti-proteasoma 20S (#617). Las flechas indican las dos bandas (presentes en todas las fracciones) utilizadas en la cuantificación que se muestra en el panel B. Las posiciones y tamaños de los marcadores de masa molecular se indican a la izquierda de la figura. **(B)** Análisis densitométrico de inmunotransferencias similares a las que se muestran en (A). Los datos, que son la media \pm desviación estándar (S.D.) de 4 experimentos diferentes, se calcularon para la misma cantidad de proteína en todas las fracciones y vienen representados como % de la absorbancia total (calculada como la suma de absorbancias de las cuatro fracciones analizadas: citosólica (CIT), nuclear (NUC), microsomal (MIC) y mitocondrial. (MIT).

El análisis densitométrico de varias preparaciones indicaba que, para la misma cantidad de proteínas en cada una de las fracciones, el nivel de proteasomas en el citosol es 15 veces mayor que en el núcleo y, aproximadamente, 7 veces mayor que en la fracción microsomal (Figura 1B). Los resultados fueron esencialmente los mismos empleando ratas sometidas a ayuno durante 20 h o ratas alimentadas, excepto que en aquéllas se encontraba, a veces, una pequeña cantidad de proteasomas asociados a la fracción mitocondrial (ver Figura 1). Esto puede ser debido a la presencia, en condiciones de ayuno, de proteasomas que son incorporados al interior de vacuolas autofágicas para su degradación por lisosomas (Cuervo *et al.*, 1995b) y que, en ocasiones, pueden contaminar la fracción mitocondrial ya que, además, por procedimientos de inmuno-oro en microscopía electrónica no se encuentran proteasomas asociados a mitocondrias (Knecht *et al.*, 1991; Rivett *et al.*, 1992). Cuando se utilizó otro anticuerpo policlonal anti-proteasoma 20S (#544) los resultados fueron los mismos (resultados no mostrados).

1.2 Localización precisa de proteasomas en la fracción microsomal

Estudios mediante técnicas de inmuno-oro o de inmunotransferencia (Palmer *et al.*, 1996) pusieron de manifiesto que si se llevaban a cabo lavados adicionales de los núcleos no disminuían apreciablemente los niveles de proteasomas asociados a ellos. Por el contrario, los proteasomas asociados a la fracción microsomal eran eliminados progresivamente en los distintos lavados (Palmer *et al.*, 1996). Sin embargo, teniendo en cuenta el volumen de la solución de lavado que se utilizaba en cada paso, el descenso con cada lavado en el nivel de proteasomas asociados a la fracción microsomal era mucho menor que el que cabría esperar si esta asociación fuese debida a una mera contaminación por proteasomas citosólicos. Además, cuando los microsomas eran tratados con cantidades crecientes de tripsina, el proteasoma era eliminado de forma progresiva, sin que dichos tratamientos afectaran de manera notable al patrón de bandas en los microsomas, observado en un gel de electroforesis de poliacrilamida-SDS (Palmer *et al.*, 1996). A partir de los resultados anteriores se concluye, por tanto, que los proteasomas asociados a la fracción microsomal se encuentran, al menos en parte, unidos débilmente a la cara externa de la membrana microsomal.

Si bien la fracción nuclear consta mayoritariamente de núcleos, la fracción microsomal contiene retículo endoplásmico rugoso y liso, componentes del complejo de Golgi y restos de la membrana plasmática. Fraccionamientos subcelulares adicionales permitieron obtener más información acerca de la distribución del proteasoma en esta fracción. Así, cuando analizamos preparaciones enriquecidas en membrana plasmática, no encontramos proteasomas asociados a la misma (resultados no mostrados). Los proteasomas tampoco aparecían asociados a las fracciones enriquecidas en el retículo endoplásmico rugoso. Por el contrario, la mayoría de los proteasomas se encontraban asociados a la fracción microsomal enriquecida en retículo endoplásmico liso (Figura 2A) y a componentes del complejo de Golgi. Cuando subfraccionamos el complejo de Golgi encontramos los proteasomas, sobre todo en la fracción enriquecida en la porción *cis* del complejo de Golgi, aunque también se detectaron en la porción *trans* (Figura 2B y C).

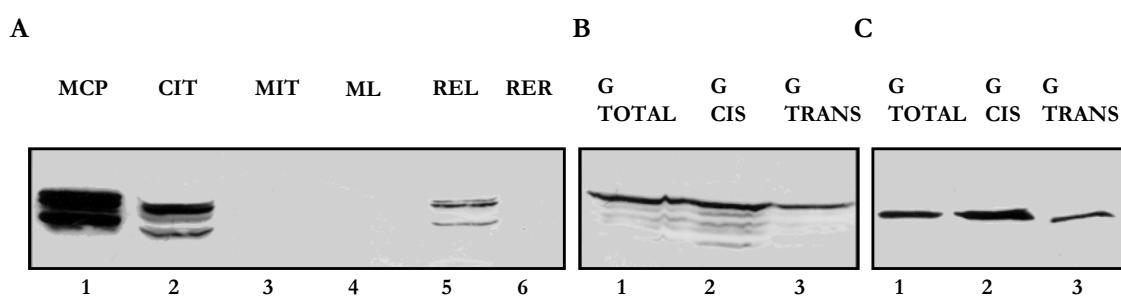


Figura 2. Inmunolocalización de proteasomas en diversas subfracciones microsomales. Se separaron 50 μ g de proteína de cada subfracción en geles de poliacrilamida-SDS y se analizaron por inmunotransferencia como en la Figura 1 con anti-proteasoma #617 (A y B) y con el anticuerpo monoclonal anti-C9 #257 (C). **(A)** carril 1, proteasomas (1 μ g, MCP); carril 2, citosol (CIT); carriles 3 y 4, mitocondrias, fracciones pesada y ligera, respectivamente (MIT y ML); carril 5, retículo endoplásmico liso (REL); carril 6, retículo endoplásmico rugoso (RER), **(B y C)** carril 1, complejo de Golgi (G_{TOTAL}); carril 2 y 3, fracciones enriquecidas en la porción *cis* (G_{CIS}) y *trans* (G_{TRANS}) del complejo de Golgi, respectivamente.

El análisis con inmuno-oro de estas subfracciones confirmó de nuevo que el marcado encontrado en los microsomas se encuentra sobre todo en las fracciones de retículo endoplásmico liso y complejo de Golgi (Palmer *et al.*, 1996 y resultados no mostrados). La pureza de las fracciones se determinó por actividades enzimáticas y/o por microscopía electrónica (Aniento *et al.*, 1993; Cuervo *et al.*, 1995b). La Figura 3 muestra la apariencia, al microscopio electrónico, de algunas de las subfracciones utilizadas en estos experimentos.

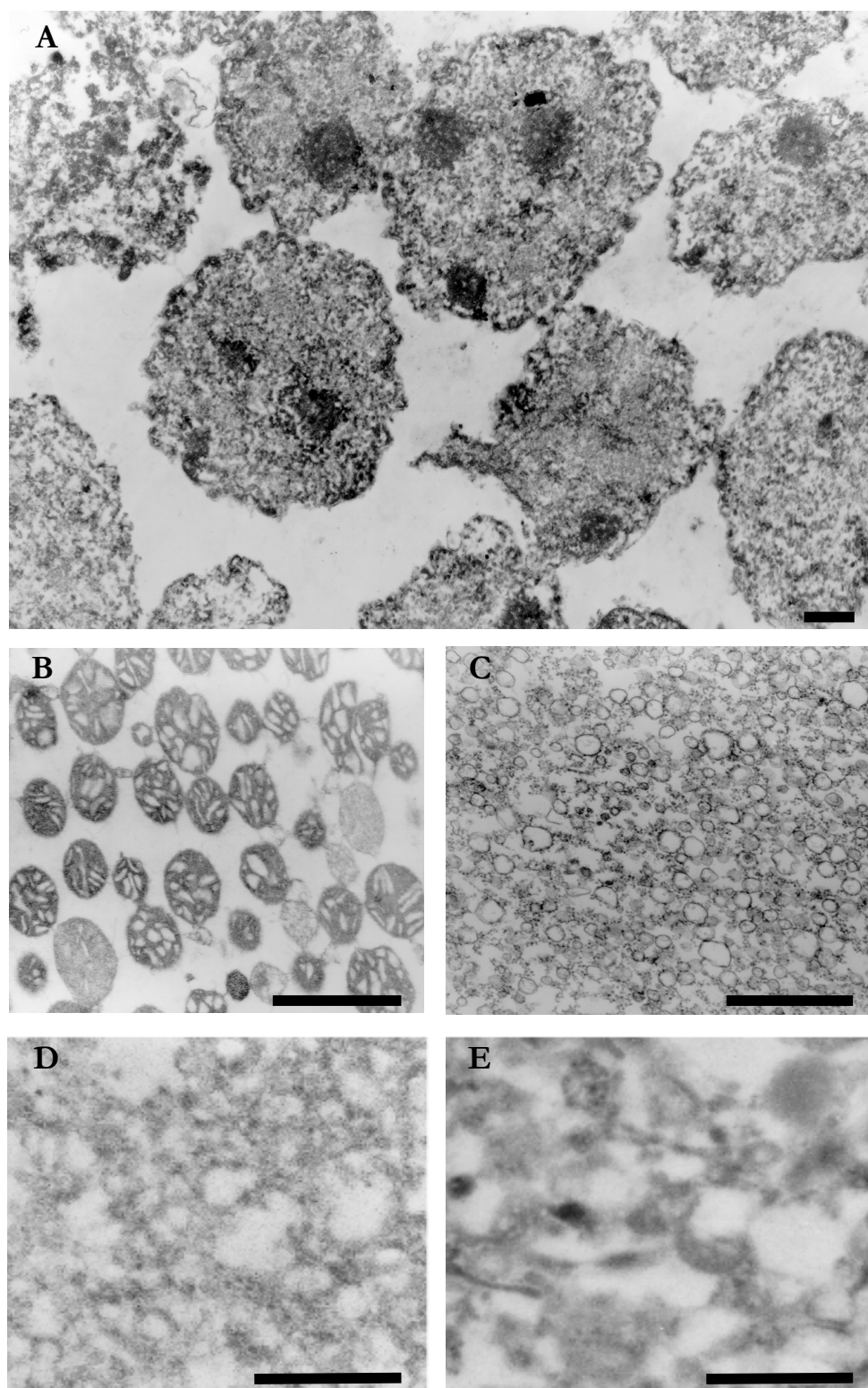


Figura 3. Morfología de las fracciones de hígado de rata utilizadas en estos estudios. (A) Núcleos, (B) mitocondrias, (C) retículo endoplásmico rugoso, (D) retículo endoplásmico liso y (E) complejo de Golgi. Barras = 1 μm (A-C) y 0.5 μm (D y E).

1.3 Distribución de diferentes subunidades del proteasoma y de los complejos que lo regulan en las fracciones nuclear, microsomal y citosólica de hígado de rata

Para investigar ahora si había alguna diferencia en la composición en subunidades entre los proteasomas localizados en los núcleos, microsomas y citosol de hígado de rata utilizamos una serie de anticuerpos monoclonales específicos contra subunidades del proteasoma 20S, tanto de tipo α como de tipo β . Utilizando anticuerpos monoclonales específicos para dos subunidades α (C8 y C9), y comparando con los resultados obtenidos con los anticuerpos policlonales contra el proteasoma 20S (#617 y #544), no encontramos diferencias en la distribución del marcado entre el núcleo, los microsomas y el citosol (ver Figura 1, Figura 4 y Tabla 1).

Sin embargo, la distribución de las subunidades β LMP2 y, sobre todo, Z (ver Figura 4 y Tabla 1) era diferente comparada con las subunidades α del proteasoma 20S. La subunidad LMP2 se mostraba enriquecida en los microsomas mientras que la localización de la subunidad Z en esta fracción era más reducida. En el núcleo, en cambio, la cantidad relativa de la

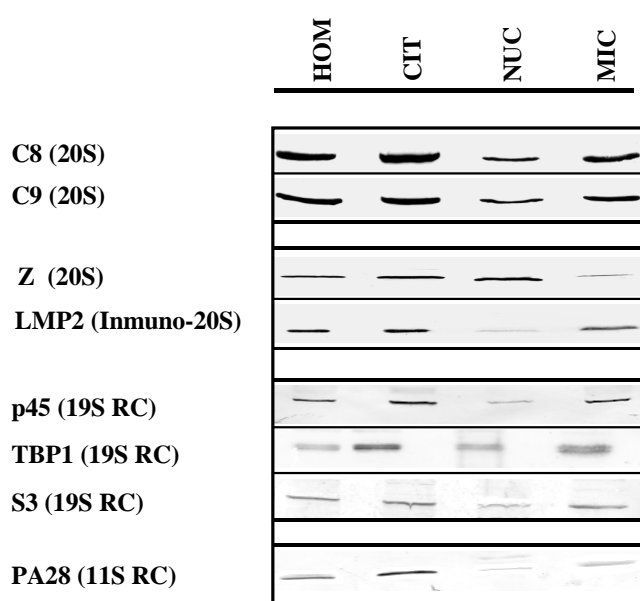


Figura 4. Immunolocalización de diferentes subunidades del proteasoma 20S, del inmunoproteasoma y de sus complejos reguladores en diversas fracciones de hígado de ratas sometidas a ayuno durante 20 h. Se separaron proteínas (25 μ g de homogenado (HOM) y de citosol (CIT) y 100 μ g de núcleos (NUC) y microsomas (MIC) en geles de poliacrilamida-SDS. Posteriormente, las proteínas se inmunotransfrieron y se analizaron con anticuerpos específicos contra las subunidades α , C8 y C9 (proteasoma 20S) y contra las siguientes subunidades β : Z (proteasoma 20S) y LMP2 (inmunoproteasoma o inmuno-20S). Asimismo, se emplearon anticuerpos contra varias subunidades del complejo regulador 19S (19S RC), tanto con actividad ATPasa (p45 y TBP1) como sin ella (S3) y contra las subunidades PA28 (α y β) del complejo regulador 11S.

subunidad Z era tres o cuatro veces mayor que la que presentan las subunidades α en este orgánulo. Por el contrario, LMP2 presentaba una concentración en el núcleo relativamente baja si se compara con las subunidades α . Por tanto, los proteasomas que se encuentran localizados en núcleo y microsomas parecen diferir en cuanto a su composición en subunidades β .

Tabla 1. Distribución de varias subunidades de los proteasomas y de sus complejos reguladores en diferentes fracciones subcelulares de hígado de rata.

Las fracciones subcelulares se prepararon a partir de hígado de ratas sometidas a ayuno durante 20 h. El porcentaje de cada subunidad en las tres fracciones se determinó mediante inmunotransferencias con cantidades iguales de proteína de cada fracción. Los datos se expresan como porcentaje \pm desviación estándar del total, calculado como la suma de las absorbancias de las fracciones citosólica, nuclear y microsomal y a partir del número de fraccionamientos subcelulares que se indican (n). Los anticuerpos utilizados son específicos para las subunidades α (C8 y C9) y β (Z del proteasoma-20S y LMP2 del inmunoproteasoma) y para subunidades de los complejos reguladores 19S (p45, TBP1 y S3) y 11S (PA28 α y β).

Subunidad	Complejo	n	Citosol	Núcleo	Microsomas
C8 (α)	20S	4	83.1 \pm 3.0	5.1 \pm 2.1	11.8 \pm 1.4
C9 (α)	20S	4	83.9 \pm 2.8	5.3 \pm 1.6	10.7 \pm 1.2
Z (β)	20S	4	80.4 \pm 5.3	18.2 \pm 4.0****	1.4 \pm 0.9****
LMP2 (β)	Inmuno-20S	5	83.8 \pm 3.5	2.2 \pm 1.8**	14.0 \pm 1.9*
p45 ATPasa	19S RC	4	75.4 \pm 2.6***	10.8 \pm 1.5**	13.8 \pm 1.5*
TBP1 ATPasa	19S RC	3	77.7 \pm 3.2*	6.8 \pm 0.7	15.4 \pm 2.6*
S3	19S RC	4	78.5 \pm 3.1*	5.3 \pm 0.8	16.2 \pm 2.9*
PA28 (α y β)	11S RC	4	84.6 \pm 2.1	1.5 \pm 0.4***	13.9 \pm 2.1

Las diferencias con respecto a los valores de absorbancia obtenidos con el anticuerpo policlonal anti-proteasoma #617 son significativas con $P < 0.05^*$, $< 0.01^{**}$, $< 0.0025^{***}$ y $< 0.0005^{****}$, respectivamente. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el test *t* de Student.

La distribución relativa de los diferentes complejos reguladores del proteasoma en fracciones subcelulares de hígado de rata reveló que varias de las subunidades del complejo regulador 19S, al igual que ocurría con el proteasoma 20S, se encuentran en el núcleo, en el citoplasma y asociadas al retículo endoplásmico. Sin embargo, observamos algunas diferencias significativas en la proporción relativa de las distintas subunidades del complejo 19S en diferentes localizaciones (Tabla 1), lo que sugiere la posibilidad de que la composición de subunidades del proteasoma 26S también puede variar según la localización. Así, la proporción relativa de las subunidades del complejo regulador 19S asociadas a la fracción microsomal es, en todos los casos, significativamente mayor que la de las subunidades α del proteasoma 20S. En cuanto a la localización nuclear de las subunidades del complejo regulador 19S observamos una diferencia en su distribución: la subunidad p45 se encuentra con un nivel significativamente mayor que las subunidades α , mientras que las subunidades TBP1 y S3 presentan un nivel similar. Finalmente, la proporción relativa de PA28 (α y β), comparativamente con las subunidades del proteasoma 20S, es mucho menor en el núcleo (Tabla 1).

Podemos concluir que la distribución de los complejos reguladores varía en las diferentes localizaciones subcelulares, encontrando, en general, una menor proporción del complejo 11S y del inmunoproteasoma en núcleo y una mayor proporción del 19S en microsomas. Además, la proporción en una de las subunidades β intercambiables aumenta en el núcleo.

Puesto que el ATP estabiliza el proteasoma 26S, llevamos a cabo un fraccionamiento subcelular en presencia y ausencia de ATP para analizar su efecto sobre el nivel de proteasomas asociados a las fracciones microsomales. Los resultados se muestran en la Tabla 2 e indican que los niveles tanto de p45 (19S RC) como de las subunidades C8 y C9 (proteasoma-20S), aumentan en los microsomas preparados en presencia de ATP. Por el contrario, los niveles de LMP2 (inmunoproteasoma) y, sobre todo, PA28 (11S RC) asociados a microsomas no cambian en presencia de ATP.

Este resultado confirma que es el proteasoma 26S el que se encuentra en elevada proporción asociado a microsomas.

Tabla 2. Efecto del ATP sobre la asociación a los microsomas del proteasoma 20S y de los complejos reguladores.

Los microsomas se obtuvieron a partir de homogenado de hígado de ratas sometidas a ayuno durante 20 h en ausencia (-ATP) o en presencia (+ATP) de 5 mM ATP.

Subunidad	Complejo	n	+ ATP/-ATP
C8 (α)	20S	5	1.69 **
C9 (α)	20S	6	2.16 **
p45 ATPasa	19S RC	4	3.25 *
LMP2 (β)	Inmuno-20S	4	1.23
PA28 (α y β)	11S RC	4	1.01

Los valores obtenidos con anticuerpos específicos para cada subunidad se expresan como la relación entre las preparaciones en presencia o ausencia de ATP y fueron significativamente diferentes con $P < 0.01^*$ y $< 0.0005^{**}$ respectivamente (los valores de significación se obtuvieron comparando los porcentajes de proteasomas asociados a microsomas en presencia y ausencia de ATP). Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el test *t* de Student.

1.4 Análisis de la presencia de subunidades libres de los proteasomas o de sus complejos reguladores en hígado de rata

Para investigar la posible presencia de subunidades libres de los proteasomas o de sus complejos reguladores, se prepararon extractos de hígado de rata en presencia de ATP y glicerol (para estabilizar los proteasomas 26S) y se fraccionaron por filtración de exclusión molecular con columnas de Superose 6 (Figura 5). Los ensayos de actividad de los diferentes proteasomas de hígado de rata, separados por estas columnas, mostraron actividad máxima para los proteasomas 26S y 20S en las fracciones 21-23 y 25-27, respectivamente (Figura 5A). Además, en las fracciones 33-34 de los extractos fraccionados de hígado de rata (Figura 5A) y en fracciones equivalentes de células en cultivo (datos no mostrados) se detectó un pequeño pico adicional de actividad hidrolítica debida a una proteasa de baja masa molecular. Aunque en extractos de timo, donde hay niveles relativamente más altos de proteasomas, el ensayo con succinil-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-metilcoumarina parece específico (Beyette *et al.*, 1998),

nuestros resultados con hígado de rata muestran que este sustrato no parece ser completamente específico de proteasomas.

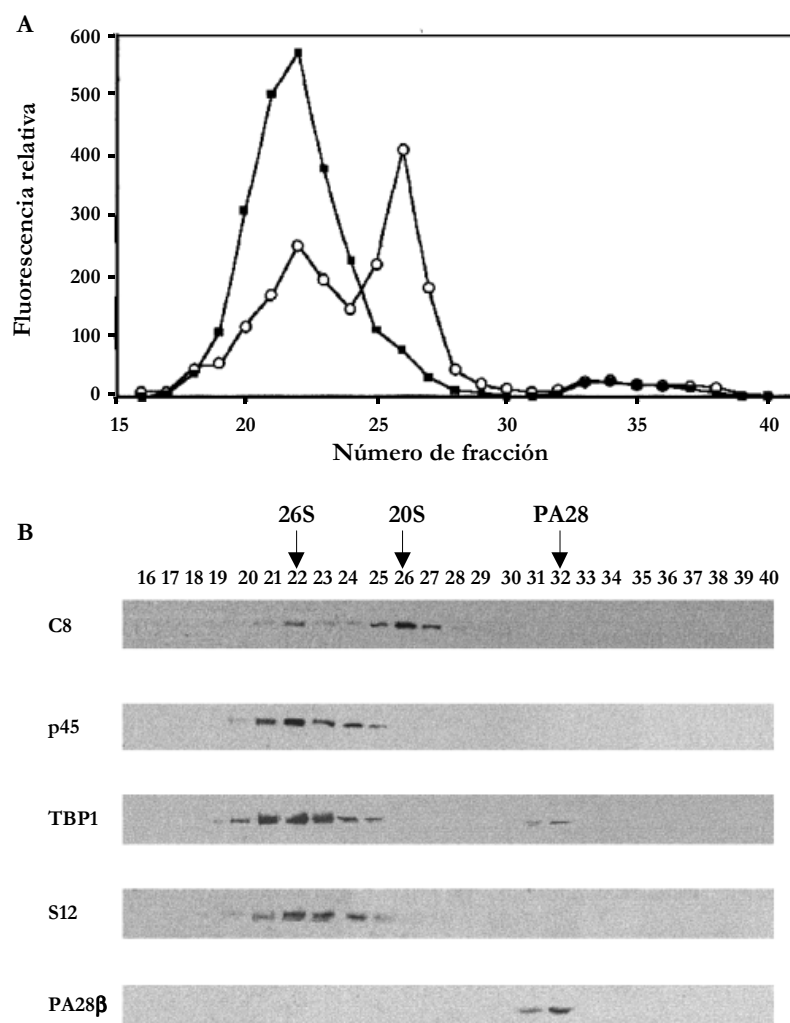


Figura 5. Análisis, por filtración de exclusión molecular e inmunotransferencia, de la presencia de subunidades libres de los proteasomas y sus complejos reguladores en hígado de rata. Se obtuvieron extractos solubles de hígado de rata y se analizaron mediante filtración de exclusión molecular como se describe en Material y Métodos. **(A)** Ensayos de actividad de proteasoma en las diferentes fracciones aisladas bajo condiciones optimizadas para el 26S (+ 5 mM ATP, ■) y para la activación de proteasomas 20S latentes (+ 0.02 % SDS, ○). **(B)** Se separaron muestras (50 μ l) de cada fracción mediante SDS/PAGE y se analizaron con anticuerpos específicos contra las subunidades C8, p45, TBP1, S12 y PA28 β como se indica en la figura. Las subunidades libres se detectarían si estuvieran presentes en las fracciones 35-40, que corresponden a una masa molecular entre 30 y 100 kDa. Se utilizaron como estándares: azul de dextrano (2,000 kDa), tiroglobulina (699 kDa), β -amilasa (200 kDa) y ovotransferrina (76 kDa).

La Figura 5B muestra el análisis por inmunotransferencia, de la distribución de subunidades individuales del proteasoma y de sus complejos reguladores, en las fracciones de la columna de filtración de exclusión molecular de la Figura 5A. Los anticuerpos utilizados eran específicos para una subunidad del proteasoma 20S (C8) y varias de los complejos reguladores 11S (PA28 β) o 19S (p45, TBP1 y S12). Las subunidades tipo α del proteasoma 20S (C8, Figura 5B y C9, resultados no mostrados), indican las fracciones donde se encuentran los proteasomas 20S y 26S. La cuantificación de los niveles relativos de C8 (Figura 5B) o C9 (datos no mostrados) en fracciones de proteasomas 20S y 26S, utilizando como estándar cantidades conocidas de complejos purificados, indicaron que los niveles de proteasomas 20S (fracciones 25-27) eran siempre de 2 a 3 veces mayores que los de proteasomas 26S (fracciones 21-23).

Las subunidades p45 ATPasa, TBP1 ATPasa y S12 del complejo regulador 19S se encontraban en las fracciones que contienen proteasomas 26S (Figura 5B). Sin embargo, observamos también una pequeña cantidad de TBP1 en las fracciones 31-32, lo que es consistente con la aparición de esta subunidad en un complejo modulador de masa molecular de 250 kDa (DeMartino *et al.*, 1996). Al igual que las subunidades p45 y S12, la subunidad no ATPasa S3 se detectó sólo en fracciones que contienen proteasomas 26S (datos no mostrados).

Con las condiciones de fraccionamiento utilizadas, los anticuerpos anti-PA28 β detectaron este complejo en las fracciones 31-32 (Figura 5B), donde cabe esperar que se encuentre el complejo 11S libre. Aunque estos resultados difieren de los de Ahn *et al.* (1996) y Hendil *et al.* (1998), que encontraron el complejo PA28 asociado con proteasomas 20S, nuestros resultados se pueden explicar por la limitada estabilidad del complejo proteasoma 20S-PA28, que se disocia en el tampón elegido aquí para optimizar la recuperación del proteasoma 26S.

Las subunidades β del inmunoproteasoma, LMP2 y LMP7, inducibles por γ interferón, las encontramos tanto en proteasomas 20S como 26S (datos no mostrados). Estos resultados se confirmaron por inmunotransferencia de proteasomas de hígado de rata purificados hasta aparente homogeneidad. Cuando se comparan cantidades equimolares de proteasomas 20S y

26S en geles (Figura 6), el nivel relativo de LMP7 y LMP2 encontrado en proteasomas 26S es aproximadamente la mitad que el encontrado en proteasomas 20S.

Por tanto, podemos decir que en hígado de rata no se encuentran subunidades libres de los proteasomas ni de sus complejos reguladores. Además, los niveles de proteasomas 20S son de 2 a 3 veces mayores que los de proteasomas 26S y el nivel relativo de LMP7 y LMP2 en proteasomas 26S es aproximadamente la mitad que en proteasomas 20S.

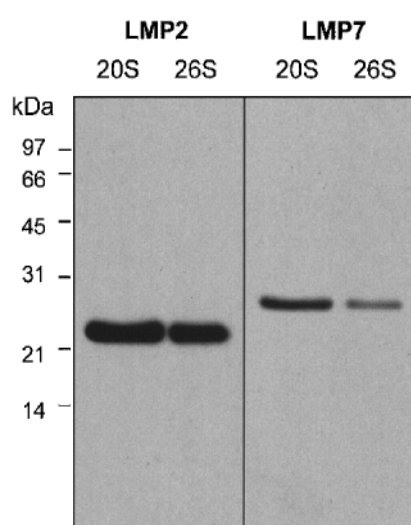


Figura 6. Las subunidades inducibles del proteasoma, LMP2 y LMP7, están presentes en preparaciones de proteasomas 20S y 26S, purificados de hígado de rata. Proteasomas 20S (1 μg) y 26S (3 μg) purificados de hígado de rata (izquierda y derecha, respectivamente, en los dos geles mostrados), separados por SDS/PAGE y analizados por ECL con anticuerpos anti-LMP2 y anti-LMP7.

1.5 Proporción relativa y distribución de los proteasomas 20S y 26S y del complejo regulador PA28 en cultivos celulares

Como las subunidades C8 y p45 no se encuentran libres y sólo se encuentran formando parte de los complejos de proteasomas (ver Figura 5B), la proporción de esas subunidades se puede tomar como medida de las cantidades relativas de los proteasomas 20S y 26S respectivamente. Utilizando anticuerpos que reconocen las subunidades C8 y p45 y cantidades conocidas de proteasomas 20S y 26S purificados, los niveles determinados en células L132 fueron $6.9 \pm 1.6 \mu\text{g}$ de proteasoma 20S/mg de proteína total y $8.5 \pm 0.8 \mu\text{g}$ de proteasoma 26S/mg de proteína total. Por tanto, los proteasomas 20S estarían presentes en un exceso entre dos y tres veces molar sobre los complejos 26S. Estos resultados son consistentes con los valores de la proporción 26S/20S obtenidos por filtración de exclusión molecular, realizados

con hígado de rata en las condiciones óptimas para la recuperación de proteasomas 26S intactos (Figura 5). Las líneas celulares cultivadas permiten estudiar fácilmente la localización del proteasoma 26S por microscopía de fluorescencia. Para ello, empleamos células embrionarias humanas L132 y anticuerpos que reconocen la subunidad p45 que está presente de forma predominante en los complejos 26S y los resultados se compararon con la distribución de proteasomas totales detectada con el anticuerpo MCP20, que se une a una subunidad α (C2) del proteasoma 20S.

En contraste con la localización observada en hígado de rata (ver Figura 1), la inmunofluorescencia asociada a la subunidad C2 aparecía con igual intensidad en el núcleo y en el citoplasma (Figura 7A). Los anticuerpos anti-p45, por otro lado, mostraron que esta proteína está mayoritariamente en el núcleo (Figura 7B), aunque también está presente en el citoplasma de células L132 (ver Discusión). Resultados similares se obtuvieron con células HeLa (datos no mostrados).

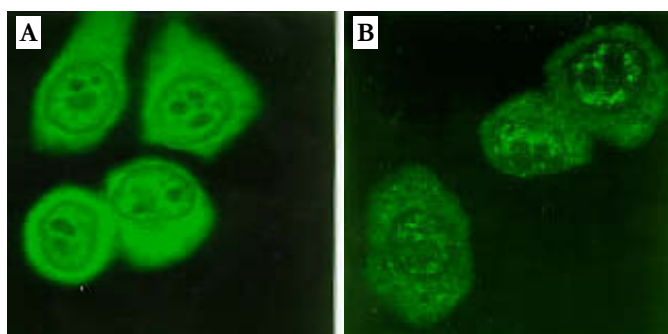


Figura 7. Localización por inmunofluorescencia, en células L132, de los proteasomas 20S y 26S. Las células L132 se fijaron con paraformaldehído (3%). La inmunofluorescencia se llevó a cabo como se describe en Material y Métodos con anticuerpos anti-C2 (A) para localizar proteasomas 20S y anticuerpos anti-p45 (B) para localizar el proteasoma 26S. En ambos casos se emplearon los mismos anticuerpos secundarios conjugados a FITC.

Decidimos también estudiar, en estas células, la localización del otro complejo regulador, el 11S. Los estudios de inmunofluorescencia con anti-PA28 α y anti-PA28 β muestran que este complejo regulador es mayoritariamente citosólico (Figura 8A y 8B) aunque se observó una pequeña cantidad de marca en el núcleo. De acuerdo con su descripción inicial

como un antígeno nuclear (Nikaido *et al.*, 1990), PA28 γ se encontró exclusivamente en el núcleo de células L132 (Figura 8C).

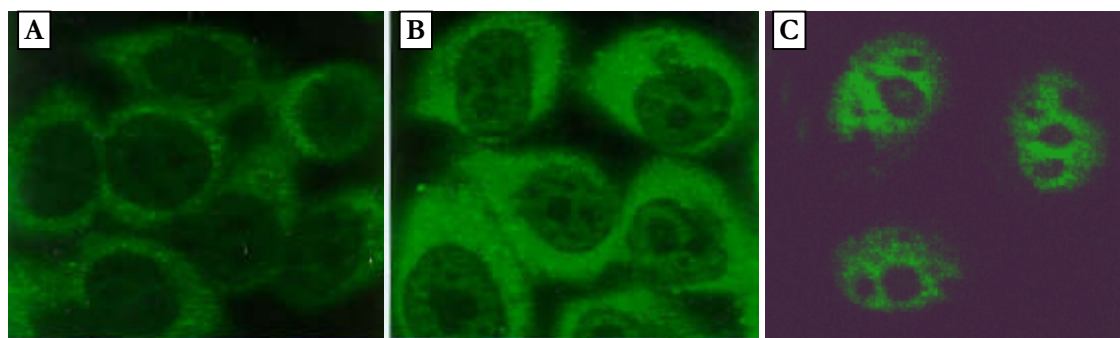


Figura 8. Localización de PA28 por inmunofluorescencia en células L132. Las células L132 fueron cultivadas sobre cubres circulares y se fijaron con metanol. La inmunofluorescencia se llevó a cabo como se describe en Material y Métodos con anticuerpos anti-PA28 α (A), anti-PA28 β (B) y anti-PA28 γ (C). En todos los casos se emplearon anticuerpos secundarios conjugados a FITC.

Puesto que Tanahashi *et al.* (1997) habían descrito una pérdida completa de la proteína PA28 γ , después del tratamiento con γ -interferón en células SW620, decidimos verificar si esto

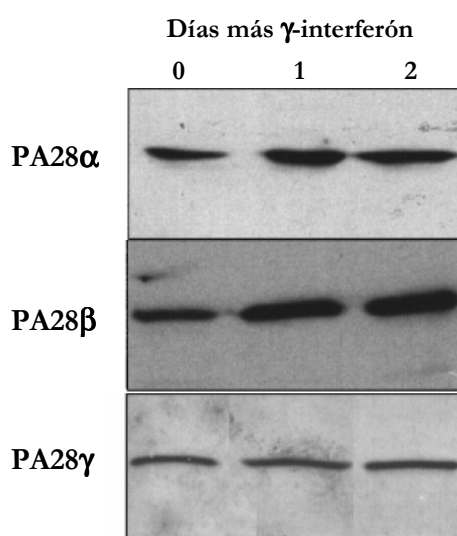


Figura 9. Efecto del γ -interferón sobre los niveles de PA28. Se trataron células L132 con γ -interferón (250 unidades/ml) durante 1 o 2 días y el extracto total de células (100 μ g) se separó por SDS/PAGE y se analizó por inmunotransferencia con anticuerpos específicos contra las subunidades PA28 α y PA28 β y contra el antígeno Ki (PA28 γ).

ocurría también en las células L132. Sin embargo, en estas células nosotros no observamos, mediante inmunotransferencia, un descenso en el nivel de proteína PA28 γ , como se muestra en la Figura 9, mientras que los niveles de PA28 α y β se incrementan tres o cuatro veces después del tratamiento con γ -interferón, tal y como cabía esperar (Groettrup *et al.*, 1996). Para investigar si este incremento conlleva algún cambio en la distribución subcelular del activador, se cultivaron las células L132 en presencia y ausencia de γ -interferón durante 4 días y se observó su distribución por inmunofluorescencia. La presencia de γ -interferón no afectó, aparentemente, la distribución de las tres subunidades, PA28 α , PA28 β y PA28 γ , entre el citoplasma y el núcleo (datos no mostrados).

2. CONTRIBUCIÓN DE LOS PROTEASOMAS Y DE OTRAS VÍAS PROTEOLÍTICAS A LA DEGRADACIÓN INTRACELULAR DE PROTEÍNAS, EN FIBROBLASTOS HUMANOS EN DIFERENTES CONDICIONES DE CRECIMIENTO

Todas las proteínas dentro de las células están en continuo recambio y aunque existen diferentes proteasas implicadas en esa degradación intracelular, son los proteasomas y los lisosomas quienes constituyen las principales vías proteolíticas, tanto en células de mamífero como en otras células eucarióticas. En concreto, se cree que los proteasomas constituyen la principal vía en la mayoría de las condiciones, especialmente cuando se degradan proteínas anormales y otras proteínas de vida media corta (ver Introducción). Sin embargo, no se ha realizado un análisis detallado de la contribución precisa de los proteasomas al conjunto de la degradación intracelular de proteínas, a pesar de que creemos que es un punto importante para conocer mejor su función.

El segundo objetivo de esta Tesis ha sido esclarecer la importancia relativa de las principales vías proteolíticas, en particular los proteasomas, en la degradación total de proteínas intracelulares, en fibroblastos humanos bajo diferentes condiciones de crecimiento, investigando separadamente las proteínas de vida media corta (VMC) y de vida media larga (VML).

2.1 Análisis de diferentes inhibidores de las vías proteolíticas proteasomales y lisosomales

En primer lugar, tratamos de seleccionar inhibidores específicos de las principales vías degradativas de proteínas intracelulares. Para determinar la degradación de proteínas, marcamos éstas con un aminoácido radiactivo y analizamos la liberación de la radiactividad soluble en ácido tricloroacético. Los fibroblastos humanos normales marcados con L-[³H]leucina o L-[³H]valina degradaban sus proteínas con una velocidad similar (datos no mostrados), lo que indica que la leucina y la valina son igualmente válidas como marcadores

para investigar la degradación de proteínas en estas células. Sin embargo, cuando se incubaban las células en paralelo y en las mismas condiciones con los dos reactivos, la radiactividad incorporada a las proteínas marcando con L-[³H]leucina era 1.5-1.6 veces superior a la obtenida marcando con L-[³H]valina. Por ello, la mayor parte de los experimentos los hemos realizado con L-[³H]leucina. Para seleccionar los inhibidores más adecuados, analizamos el efecto de varios de ellos a diferentes concentraciones sobre la degradación de proteínas de vida media larga en células en crecimiento exponencial en ausencia de suero. Elegimos estas condiciones porque: i) las proteínas de vida media larga constituyen el conjunto de proteínas más abundante en las células, ii) en condiciones de ausencia de suero se produce un aumento en la degradación de proteínas, y iii) se cree que sólo bajo estas condiciones, pero no en presencia de suero, los lisosomas son importantes para la degradación de proteínas.

Entre los agentes que han sido más comúnmente utilizados (Lee y Goldberg, 2001) para inhibir a los proteasomas en células de mamífero, la inhibición más efectiva la obtuvimos con el MG132 que bloqueaba más del 90% de la degradación intracelular de proteínas a concentraciones iguales o superiores a 10 μ M (Figura 10A). Otro inhibidor, el ALLN, también resultó muy efectivo cuando se utilizaba a altas concentraciones. Por el contrario, la máxima inhibición obtenida con la lactacistina, o con un derivado de la misma, la β -clasto lactona, y con otro inhibidor del proteasoma, la epoxomicina (datos no mostrados), fue sólo la mitad de la obtenida con MG132 y ALLN (Figura 10A). También probamos el MG262, un derivado del MG132 que se considera un inhibidor más potente de proteasomas purificados que el propio MG132, y encontramos que la inhibición máxima fue similar o ligeramente inferior a la obtenida con la lactacistina (Figura 10A).

Entre los inhibidores de lisosomas que ensayamos (bafilomicina A, concanamicina A, pepstatina A, leupeptina, cloroquina, NH_4Cl y combinaciones de los mismos), la mayor inhibición de la degradación se produjo cuando utilizamos conjuntamente el NH_4Cl (20 mM) y la leupeptina (100 μ M) (datos no mostrados). En la Figura 10B se muestran las inhibiciones que se producían empleando diferentes concentraciones de NH_4Cl o de leupeptina, por separado o en combinación con una concentración fija del otro inhibidor lisosomal (0.1 mM de leupeptina y 20 mM de NH_4Cl). La mayor inhibición se debe al NH_4Cl , ya que el efecto producido por esta base débil (especialmente a concentraciones de 20 mM o superiores) sólo

es sensiblemente inferior (menos del 10%) a la inhibición producida por el NH_4Cl más la leupeptina (ver también en la Figura 10C los dos histogramas de la izquierda). Por tanto, el NH_4Cl también afecta a la mayor parte de la degradación de proteínas que es inhibida por la leupeptina.

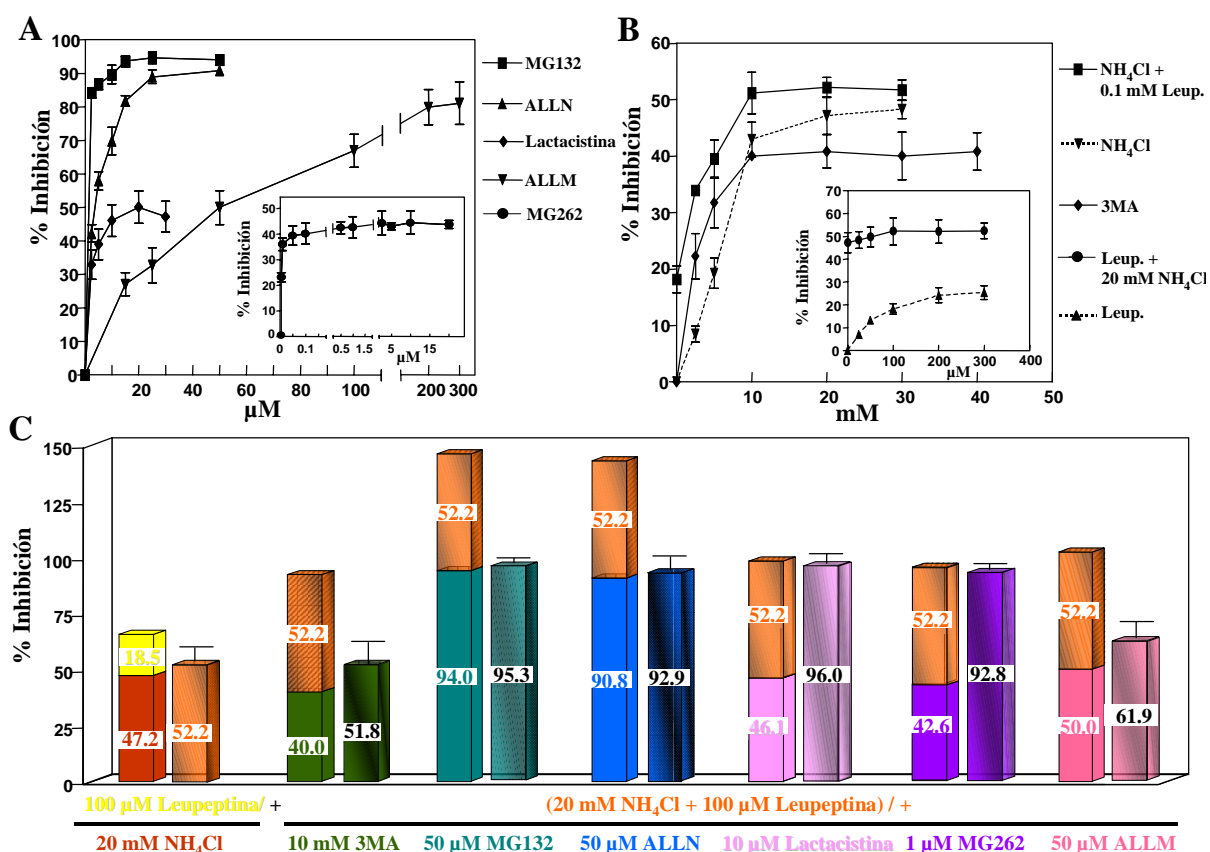


Figura 10. Efectos de diferentes inhibidores de proteasomas y de lisosomas sobre la degradación intracelular de proteínas de vida media larga en fibroblastos humanos en crecimiento exponencial e incubados en ausencia de suero.

(A) La inhibición de la degradación de proteínas se analizó como se describe en Material y Métodos durante 3 h y empleando diferentes concentraciones de: MG132 (■), ALLN (▲), lactacistina (◆) y ALLM (▼). La figura insertada muestra la inhibición producida por diferentes concentraciones de MG262 (●). (B) Inhibición de la degradación de proteínas por diferentes concentraciones de: NH_4Cl (▼), NH_4Cl + 0.1 mM leupeptina (■) y 3-MA (◆). La Figura insertada muestra la inhibición producida por diferentes concentraciones de leupeptina (▲) y leupeptina + 20 mM NH_4Cl (●). (C) Inhibición de la degradación de proteínas por diferentes combinaciones de inhibidores a las concentraciones indicadas (histograma de la derecha en cada pareja de histogramas). Se muestran también en los histogramas de la izquierda de cada pareja de histogramas los efectos de cada inhibidor por separado, para cada combinación probada (como se indica debajo) y, por consiguiente, los valores esperados si las inhibiciones fueran aditivas. La inhibición se expresa como porcentaje y cada valor es la media \pm S.D. de al menos cuatro experimentos diferentes con muestras por duplicado.

La principal vía lisosomal de degradación intracelular de proteínas, la macroautofagia, se inhibe por la 3-metiladenina (3-MA), un agente que actúa impidiendo la formación de vacuolas autofágicas (Seglen y Gordon, 1982; Seglen *et al.*, 1986) y que produce su máximo efecto a 10 mM (Figura 10A). Por otro lado, con la wortmanina, un inhibidor bien conocido de las 3'fosfatidil inositol quinasas (PI3-K), obtuvimos un efecto similar a concentraciones de 100 nM o superiores (datos no mostrados). Estos resultados concuerdan con lo observado en hepatocitos (Blommaart *et al.*, 1997), en los que la 3-MA afecta a la macroautofagia por la inhibición de estos enzimas. Podemos observar en la Figura 10B y 10C (segundo par de histogramas) que el efecto de inhibición de la 3-MA es alto, pero significativamente más bajo ($P < 0.05$) que los valores obtenidos con leupeptina más NH_4Cl (o incluso sólo con NH_4Cl) cuando se utilizan a sus concentraciones óptimas (ver también Figura 10C, segundo par de histogramas).

Además, analizamos los efectos producidos por la combinación de leupeptina más NH_4Cl con MG132, MG262, ALLN, lactacistina y 3-MA (Figura 10C). Todos estos agentes se utilizaron a sus concentraciones óptimas para obtener la máxima inhibición (Figura 10A y B) y para facilitar las comparaciones se indican también, en el histograma de la izquierda, los valores aditivos esperados para las diferentes combinaciones de inhibidores cuando se utilizan por separado. Entre los inhibidores del proteasoma, MG132, ALLN, MG262 y lactacistina, sólo estos dos últimos (y también la β -clasto lactona y epoxomicina, datos no mostrados) produjeron un claro efecto aditivo con los inhibidores de lisosomas, NH_4Cl más leupeptina (Figura 10C). También se ve aquí (segundo par de histogramas en la Figura 10C) que la adición de 3-MA no incrementa la inhibición producida por NH_4Cl más leupeptina (51.8 *versus* 52.2%). Por tanto asumimos que el NH_4Cl más la leupeptina inhiben completamente la macroautofagia a las concentraciones utilizadas y que el porcentaje de proteínas cuya degradación se inhibe por NH_4Cl más leupeptina, pero no por 3-MA, representaría la proteína que es degradada por vías lisosomales diferentes de la macroautofagia (microautofagia, autofagia mediada por chaperonas, etc.).

Estos resultados indican que el MG132 y el ALLN, al menos bajo las condiciones que hemos estudiado aquí, inhiben las vías lisosomales con bastante eficiencia. Esta fuerte inhibición también se observó a concentraciones más bajas de MG132 (12 y 25 μM) y de

ALLN (25 μM), mientras que los efectos de inhibición de la lactacistina a concentraciones más bajas seguían siendo aditivos (datos no mostrados) según lo esperado.

Cuando el MG132 y el ALLN se combinan con la lactacistina, NH_4Cl más leupeptina y/o 3-MA, se puede calcular (cuando se comparan sus efectos con los producidos por NH_4Cl más leupeptina y por lactacistina) que el MG132 o el ALLN, a 50 μM , inhiben el 95-100% de la degradación proteasomal y lisosomal (por macroautofagia o por otras vías lisosomales). También ensayamos, en experimentos similares, el efecto del ALLM a 50 μM , porque esta concentración ha sido utilizada para inhibir proteasomas. Sin embargo, a dicha concentración sólo produce el 60% de su efecto máximo, que se obtiene a 200-300 μM (Figura 10A). A pesar de que hay un efecto parcialmente aditivo del ALLM con el NH_4Cl más leupeptina (Figura 10C), el ALLM a 50 μM inhibe el 77.2% de la degradación lisosomal pero sólo el 21.0% de la degradación proteasomal. Sin embargo, esta última inhibición aumenta a concentraciones más altas de ALLM (por ejemplo, la inhibición del proteasoma es de 68.9% cuando se emplea una concentración 100 μM del inhibidor).

En resumen, y basándonos en los resultados anteriores, en los siguientes experimentos utilizamos la lactacistina (10 μM) para inhibir las vías proteasomales, leupeptina (0.1mM) más NH_4Cl (20 mM) para inhibir todas las vías lisosomales (incluyendo la macroautofagia) y la 3-MA para inhibir la degradación macroautofágica. La contribución de las vías lisosomales no macroautofágicas la calculamos por diferencia entre la inhibición obtenida con el NH_4Cl más la leupeptina y la obtenida con la 3-MA. Finalmente, la contribución a la degradación intracelular de proteínas por otras vías no lisosomales y no proteasomales la obtuvimos calculando la degradación remanente después de la inhibición combinada de proteasomas y lisosomas, con lactacistina y NH_4Cl más leupeptina, o después de la inhibición con MG132 (50 μM) que, como hemos dicho, bloquea de manera prácticamente completa ambas vías proteolíticas.

2.2 Contribución de las principales vías proteolíticas a la degradación de proteínas de vida media corta

2.2.1 Cinéticas de degradación de proteínas marcadas durante pulsos de 5, 15, 30 y 60 min en fibroblastos humanos

Puesto que se cree que los proteasomas constituyen la principal vía degradativa de proteínas de vida media corta, analizamos primero las cinéticas de degradación de proteínas marcadas durante pulsos breves, en fibroblastos humanos creciendo exponencialmente y en presencia de suero. En la Figura 11 se muestra la pérdida de la radiactividad, en función del tiempo, que procede de proteínas intracelulares marcadas con L-[³H]leucina durante diferentes tiempos de pulso: 5, 15, 30 y 60 minutos. Podemos ver que la cantidad de proteína que se degrada, a un tiempo de caza determinado, aumenta cuando disminuye el tiempo de pulso y este incremento se debe a una rápida degradación en los tiempos iniciales de caza ya que, después de 8 h, las distintas curvas de caída de radiactividad parecen ser paralelas.

La cinética de degradación de proteínas es una cinética de primer orden y la vida media es una forma adecuada de expresar estas cinéticas. En la Figura 12 representamos en escala semilogarítmica los valores experimentales de la Figura 11 mostrando los mejores ajustes lineales (ver los coeficientes de correlación, r^2), que se obtuvieron en todos los casos cuando se consideraban dos cinéticas de primer orden. Esas dos cinéticas están separadas por una discontinuidad que aparece con más claridad a tiempos de pulso más cortos (Figura 11). Por lo tanto, las curvas experimentales se descomponen en dos funciones exponenciales, como se describe en Material y Métodos, una que corresponde a proteínas que desaparecen lentamente (proteínas de vida media larga) y otra a proteínas de desaparición rápida (proteínas de vida media corta).

En la Figura 12 y en la Tabla 3 se muestran los valores de vida media para los dos grupos de proteínas a los diferentes tiempos de pulso analizados. Aunque la vida media de las proteínas de vida media corta permanece constante (1.1-1.3 h), la del grupo de proteínas de vida media larga experimenta un incremento a tiempos de pulso más prolongados, desde 64.2h

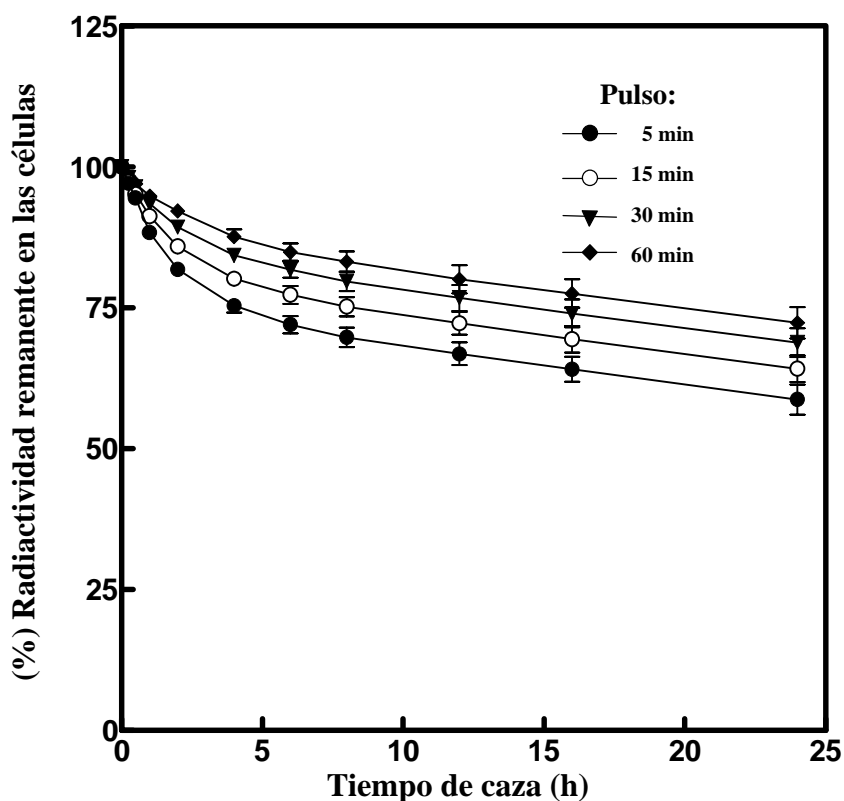


Figura 11. Cinéticas de degradación de proteínas de fibroblastos humanos marcadas radiactivamente durante tiempos de pulso de 5, 15, 30 y 60 min.

Los fibroblastos humanos se marcaron con L-[^3H]leucina durante 5 (●), 15 (○), 30 (▼) o 60 (◆) min y la radiactividad insoluble en ácido tricloroacético en las células se calculó como se describe en Material y Métodos y se expresa como porcentaje de la radiactividad inicial. Cada punto es la media \pm S.D. de cuatro experimentos diferentes con muestras por duplicado.

(5 min de pulso) hasta 79.9 h (60 min de pulso). Esto indica que las proteínas de vida media corta constituyen un grupo de proteínas que son degradadas con una velocidad similar, mientras que el grupo de proteínas de vida media larga está compuesto por proteínas con diferentes vidas medias (como se sabe bien por la bibliografía).

En la Tabla 3 se resume el análisis de estas proteínas para los diferentes tiempos de pulso. Cuando se prolonga el tiempo de pulso se incrementa la marca en proteínas que desaparecen más lentamente, lo que explica el aumento en la vida media promedio de dichas proteínas. Sin embargo, después de una hora de pulso todavía existe una clara separación entre ambos grupos de proteínas, ya que sigue habiendo una discontinuidad en las velocidades de degradación (Figura 12). También podemos ver que la marca relativa (valores n_s y n_L para vida

media corta y larga respectivamente, calculados como se describe en Material y Métodos) de ambos grupos de proteínas depende del tiempo de pulso, incrementándose la cantidad de proteínas de vida media corta que se marcan en los pulsos más cortos.

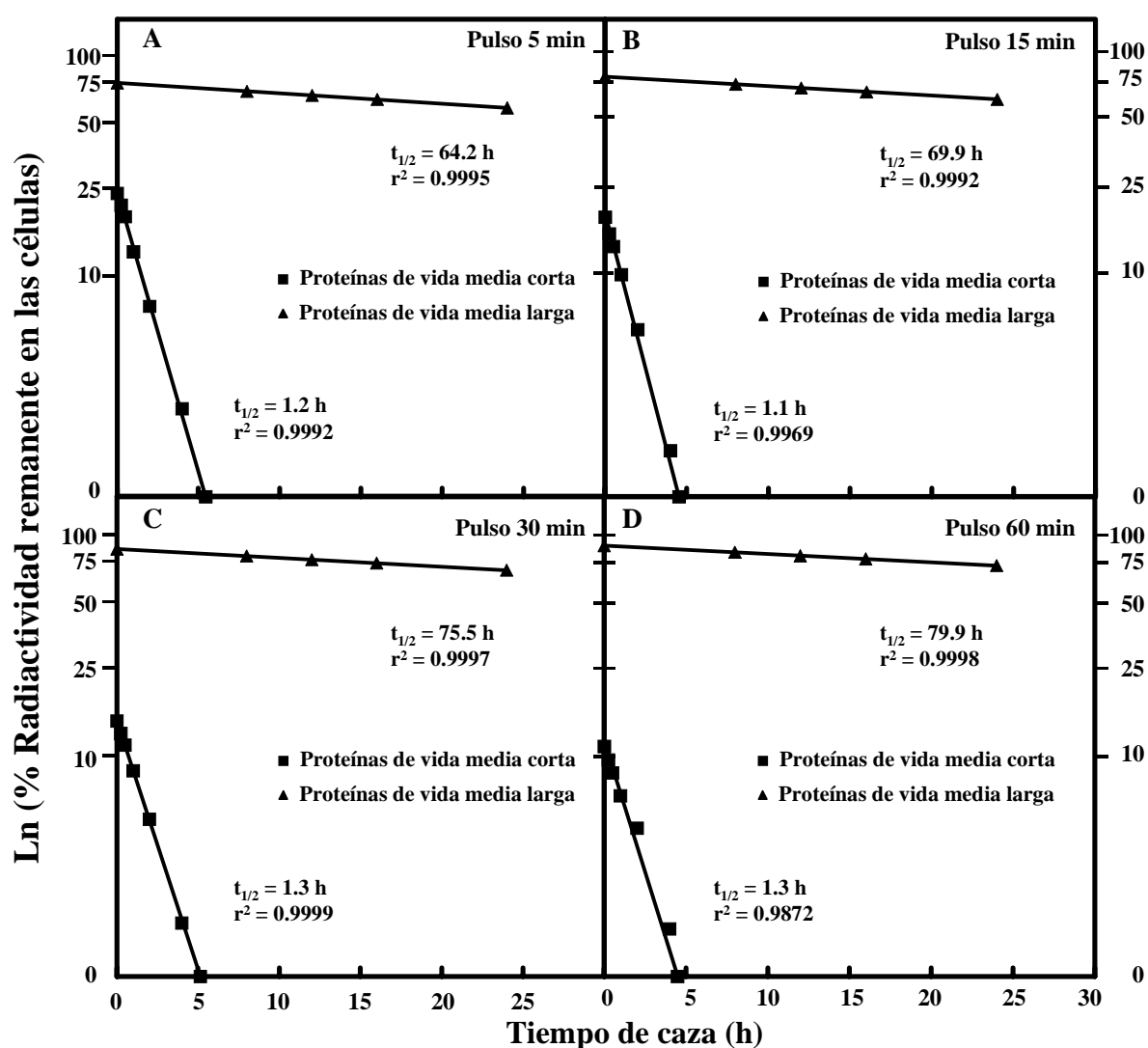


Figura 12. Análisis de las cinéticas de degradación de proteínas de vida media corta y larga de fibroblastos humanos marcadas radioactivamente durante tiempos de pulso de 5, 15, 30 y 60 min.

En cada panel se muestran las dos cinéticas de primer orden (que corresponden a proteínas de vida media corta ■ y larga ▲) que son el resultado del análisis y de la descomposición de los valores experimentales de las cinéticas de degradación de proteínas de fibroblastos humanos marcadas durante tiempos de pulso de 5 (A), 15 (B), 30 (C) y 60 (D) min como se describe en Material y Métodos. También se indican los coeficientes de correlación (r^2) de las rectas de regresión lineal y las vidas medias ($t_{1/2}$) calculadas a partir de las mismas.

Tabla 3. Proporciones relativas de radiactividad incorporada (n), vidas medias ($t_{1/2}$) y niveles de proteína en estado estacionario (N) de proteínas de vida media corta (S) y larga (L) en fibroblastos humanos marcados con L-[^3H]leucina durante los tiempos de pulso indicados.

Tiempo de pulso	n_s (%)	$t_{1/2s}$ (h)	N_s (%)	n_L (%)	$t_{1/2L}$ (h)	N_L (%)
5 min	24.3 ± 1.4	1.2 ± 0.2	0.61	76.1 ± 0.6	64.2 ± 3.7	99.39
15 min	19.5 ± 1.9*	1.1 ± 0.2	0.41	81.4 ± 0.7***	69.9 ± 4.2	99.59
30 min	14.3 ± 1.3***	1.3 ± 0.2	0.33	85.7 ± 0.7***	75.5 ± 5.0*	99.67
60 min	11.7 ± 1.9***	1.3 ± 0.3	0.27	89.0 ± 0.7***	79.9 ± 5.5**	99.73

Los resultados, calculados como se indica en Material y Métodos, son la media ± S.D. de cuatro experimentos diferentes con muestras por duplicado. Los valores n se calcularon separadamente a partir de las cinéticas experimentales de proteínas de vida media corta y larga y, por tanto, la suma de n_s y n_L , para un tiempo de pulso determinado, no es exactamente 100%. Sin embargo, los valores reales deben estar muy próximos a los valores mostrados. Las diferencias con los valores obtenidos para 5 minutos de pulso fueron significativas con $P < 0.05$, 0.005 y 0.0005 (*, ** y *** respectivamente).

Esto último puede verse mejor en la Figura 13. Aunque la utilización de tiempos inferiores a 5 min es difícil de conseguir experimentalmente, la extrapolación hasta ordenadas de la curva mostrada en la Figura 13, indica que alrededor del 30% de las proteínas de nueva síntesis, en fibroblastos humanos, son degradadas rápidamente. Esto debe ser así teniendo en cuenta además que, debido al lavado de las células, las medidas comenzaron aproximadamente dos minutos después de la finalización del pulso, por lo que los valores reales de la radiactividad incorporada a proteínas de vida media corta podrían aún ser más altos. Finalmente, la cantidad de proteínas de vida media larga y corta en estado estacionario (valores N de la Tabla 3) permanece constante, aunque los niveles de proteínas de vida media corta disminuyen ligeramente con el incremento del tiempo de pulso. Este hecho probablemente, se debe a que, bajo estas condiciones, se incrementa la estabilidad de las proteínas de vida media larga pero no las de vida media corta (ver las vidas medias de las proteínas de vida media larga a diferentes tiempos de pulso en la Tabla 3), por lo que su proporción relativa será mayor.

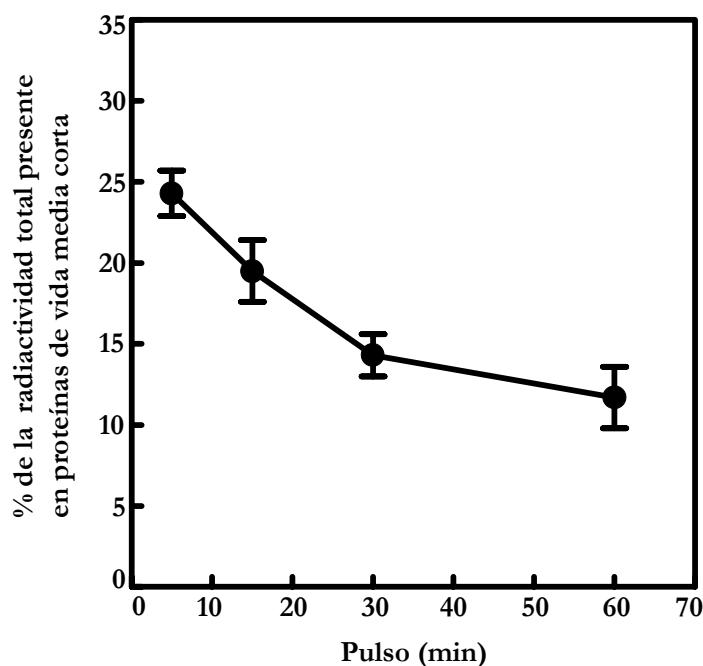


Figura 13. Porcentaje de proteínas de vida media corta marcadas radiactivamente durante tiempos de pulso de 5, 15, 30 y 60 min en fibroblastos humanos.

En esta figura se muestra el porcentaje calculado de proteínas de vida media corta (n_s) que se marcan radioactivamente con los diferentes tiempos de pulso (5, 15, 30 y 60 min).

2.2.2 Cinéticas de degradación de proteínas marcadas durante 15 min en fibroblastos humanos en diferentes condiciones de crecimiento

A continuación, analizamos las cinéticas de degradación de proteínas, en fibroblastos humanos en 4 condiciones de crecimiento diferentes (exponencial y confluyente, en presencia o ausencia de suero), marcadas durante un único tiempo de pulso de 15 min (ver Figura 14). Previamente nosotros establecimos las condiciones precisas de crecimiento exponencial y confluyente en fibroblastos humanos sin pérdida de la viabilidad celular (ver Material y Métodos). Observamos algunas diferencias en la velocidad de degradación, particularmente en condiciones de ausencia de suero. Si se comparan células confluentes con (cnf.) o sin suero (cnf./SW) con células en crecimiento exponencial en presencia (exp.) o ausencia de suero (exp./SW) respectivamente, también encontramos un ligero aumento en la degradación que es sobre todo visible en los tiempos últimos de caza.

Cuando se analizan bajo las diferentes condiciones de crecimiento las cinéticas de degradación de las proteínas marcadas durante el pulso de 15 min, como se hizo en la Figura 12, separando el grupo de proteínas de vida media corta y larga (Figura 15 y Tabla 4), encontramos que la marca relativa de ambos grupos de proteínas (valores de n en la Tabla 4) permanece constante y que las diferencias observadas en las cinéticas de degradación se deben principalmente a variaciones en las vidas medias del grupo de proteínas de vida media larga. Aunque se observa cierta aceleración en la degradación de proteínas de vida media corta, especialmente bajo condiciones de confluencia (Tabla 4), esas pequeñas diferencias derivan probablemente de la forma indirecta de calcular la vida media de estas proteínas (ver Material y Métodos). Por otro lado, las cantidades en estado estacionario de las proteínas de vida media

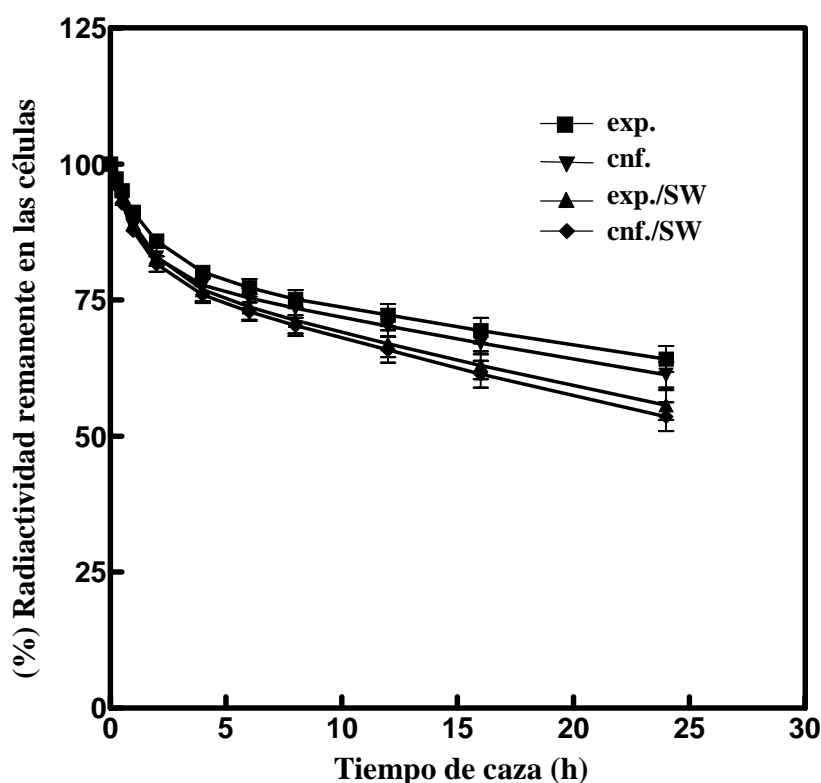


Figura 14. Cinéticas de degradación de proteínas marcadas durante 15 min en fibroblastos humanos en diferentes condiciones de crecimiento.

Los fibroblastos humanos creciendo exponencialmente (exp. , ■, ▲) o en confluencia (cnf. , ▼, ◆) se marcaron con L- ^3H]leucina durante 15 min y se incubaron en presencia (■, ◆) o ausencia (▲, ▼, SW) de suero. La radiactividad en las células, a los diferentes tiempos de caza, se calculó como se describe en Material y Métodos y se expresa como porcentaje de la radiactividad inicial. Cada punto es la media \pm S.D. de cuatro experimentos diferentes con muestras por duplicado. Las diferencias con los valores obtenidos en condiciones de crecimiento exponencial fueron significativas con $P < 0.005$ (condiciones SW).

corta (N_s en la Tabla 4) aumentan sensiblemente cuando la estabilidad de las proteínas de vida media larga disminuye (comparar las diferentes condiciones sin suero y con suero), lo que indicaría de nuevo que las condiciones de crecimiento afectan muy poco o nada a la estabilidad de las proteínas de vida media corta.

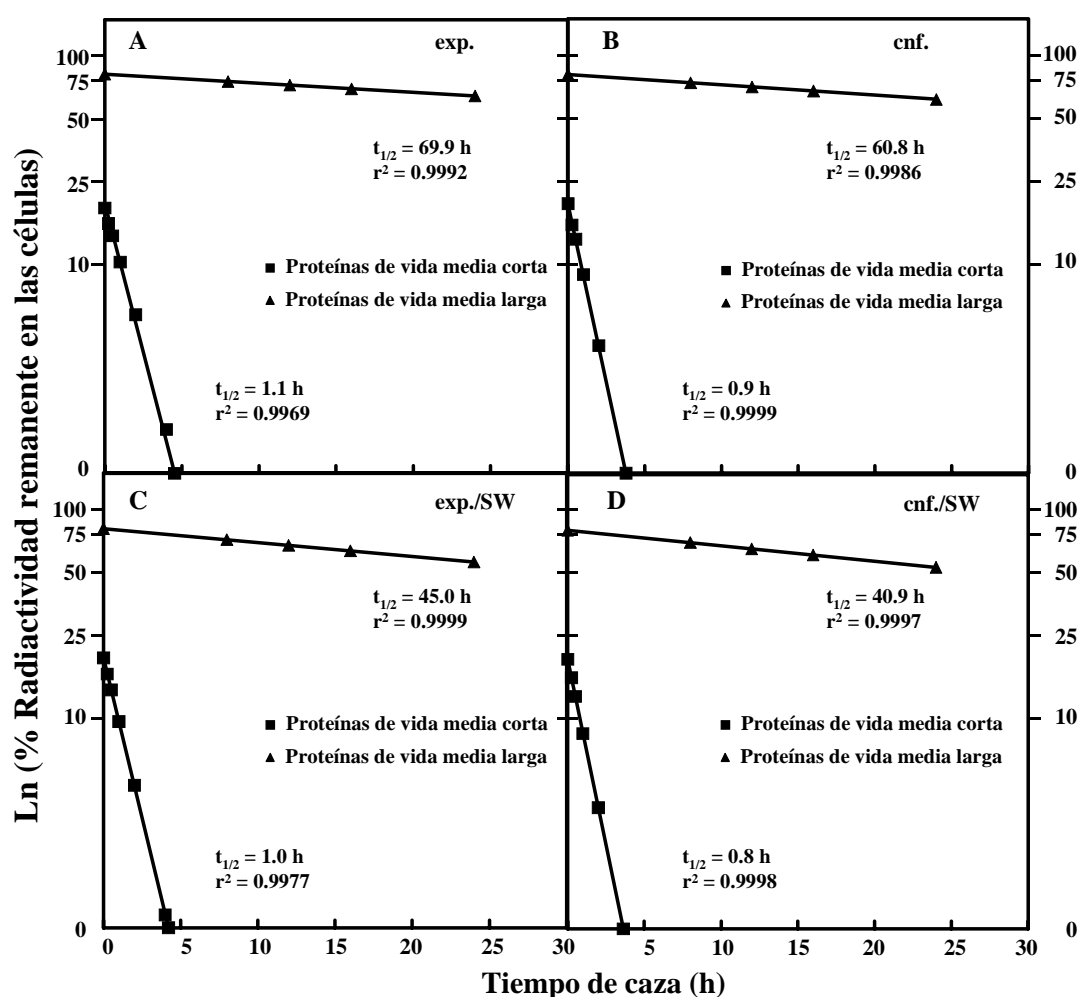


Figura 15. Cinéticas de degradación de proteínas de vida media corta y larga, en fibroblastos humanos en diferentes condiciones de crecimiento, marcadas radioactivamente durante 15 min. Los paneles A-D muestran las dos cinéticas de primer orden (proteínas de vida media corta, ■, y de vida media larga, ▲) que resultan del análisis y la descomposición de los valores experimentales de la degradación de proteínas marcadas durante un pulso de 15 min, en fibroblastos humanos en crecimiento exponencial (exp., paneles A y C) y confluyente (cnf., paneles B y D) e incubados en presencia (paneles A y B) o ausencia (SW, paneles C y D) de suero. También se indican los coeficientes de correlación (r^2) de las rectas de regresión lineal y las vidas medias ($t_{1/2}$).

Tabla 4. Proporciones relativas de radiactividad incorporada (n), vidas medias ($t_{1/2}$) y niveles de proteína en estado estacionario (N) de proteínas de vida media corta (S) y larga (L) en fibroblastos humanos marcados durante 15 min con L-[^3H]leucina.

Condiciones de crecimiento	n_S (%)	$t_{1/2S}$ (h)	N_S (%)	n_L (%)	$t_{1/2L}$ (h)	N_L (%)
Exp.	19.5 ± 1.9	1.1 ± 0.2	0.41	81.4 ± 0.7	69.9 ± 4.2	99.59
Exp./SW	19.2 ± 1.4	1.0 ± 0.2	0.56	81.7 ± 0.6	45.0 ± 3.6**	99.44
Cnf.	21.2 ± 2.3	0.9 ± 0.2	0.42	81.3 ± 0.8	60.8 ± 4.4*	99.58
Cnf./SW	18.7 ± 2.1	0.8 ± 0.2	0.49	82.0 ± 0.7	40.9 ± 3.8**	99.51

Para más detalles ver la Tabla 3. Exp.: exponencial; Cnf.: confluyente; y SW: ausencia de suero durante los tiempos de caza. Las diferencias con los valores obtenidos en condiciones de crecimiento exponencial fueron significativas con $P < 0.05$ y 0.0005 (* y ** respectivamente).

2.2.3 Contribución de los proteasomas y de otras vías proteolíticas a la degradación de las proteínas de vida media corta en diferentes condiciones de crecimiento

Se cree que los proteasomas son la principal vía proteolítica que degrada proteínas de vida media corta (ver Introducción) y para confirmar este punto, analizamos el efecto de los inhibidores que habíamos identificado previamente como los más apropiados (ver apartado 2.1 y Figura 10). Como inhibidores de los proteasomas utilizamos lactacistina, β -clasto lactona y epoxomicina y, puesto que se obtuvieron resultados similares con los tres inhibidores proteasomales, sólo se muestran en este apartado los resultados obtenidos con β -clasto lactona. La contribución de otras vías lisosomales a la degradación de proteínas se calculó, tal y como se comentó antes, a partir de la diferencia entre la inhibición obtenida con la leupeptina más el NH_4Cl y la obtenida con la 3-MA. Finalmente, la contribución de otras vías proteolíticas, diferentes a proteasomas y a lisosomas (otras vías), se calcula a partir de la degradación que es insensible tanto a los inhibidores del proteasoma (β -clasto lactona) como a los de lisosomas (leupeptina más NH_4Cl).

La Figura 16 muestra las contribuciones, de las diferentes vías proteolíticas a la degradación de proteínas marcadas (Figura 16A) durante un pulso de 15 min y al grupo de proteínas de vida media larga que se degradan junto a las proteínas de vida media corta y, por tanto, contribuyen a la cinética de degradación de las proteínas marcadas durante los 15 min de pulso (Figura 16B), en células bajo diferentes condiciones de crecimiento. Para calcular esos valores, lavamos las células inmediatamente tras el pulso (proteínas marcadas durante 15 min) y tras 8 h (proteínas de vida media larga, ya que tras 8 h las proteínas de vida media corta se habrán degradado). Después, se añadieron los inhibidores al medio y, una hora más tarde para permitir que los inhibidores actuaran con la máxima eficiencia, analizamos la degradación de

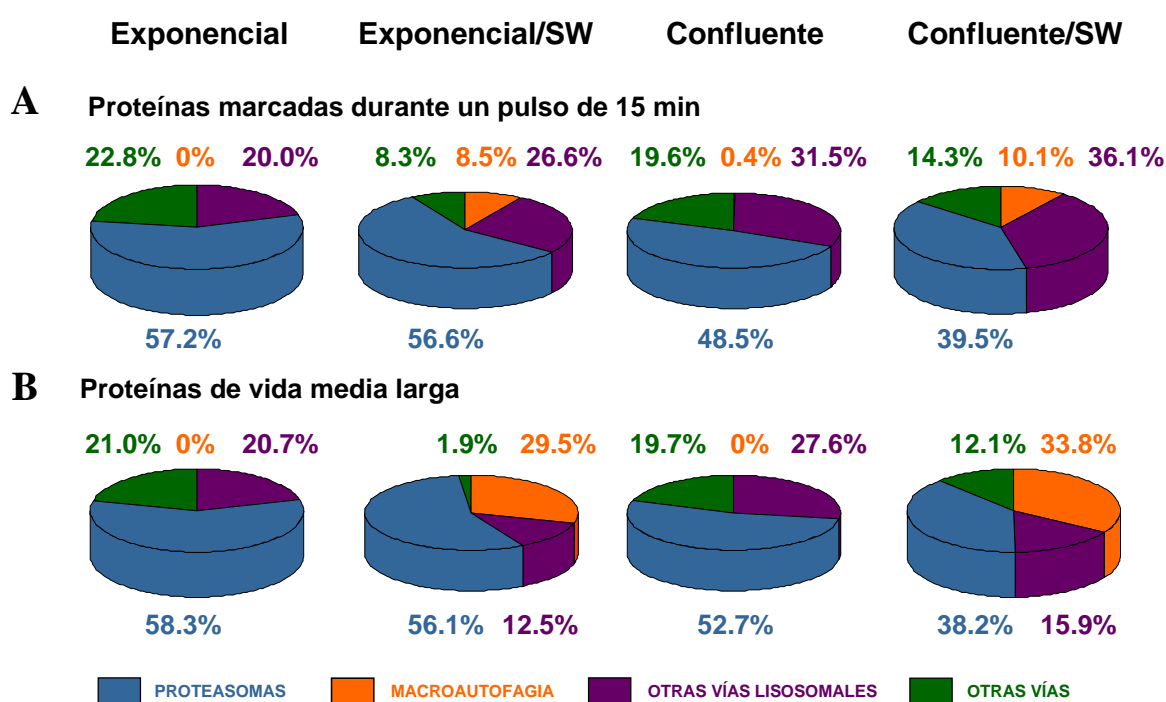


Figura 16. Contribución de los proteasomas, la macroautofagia, las vías lisosomales no macroautofágicas y las restantes vías a la degradación de proteínas marcadas durante 15 min (A) y de proteínas de vida media larga (B) en fibroblastos humanos incubados bajo diferentes condiciones de crecimiento.

La contribución de varias vías proteolíticas (proteasomas, macroautofagia, vías lisosomales no macroautofágicas y otras vías) a la degradación de proteínas marcadas durante un pulso de 15 min (A) y proteínas de vida media larga (B) en fibroblastos en crecimiento exponencial y confluyente incubados con o sin suero (SW) se calculó como se describe en el texto, utilizando β - clasto lactona, 3-MA y NH_4Cl + leupeptina para inhibir los proteasomas, la macroautofagia y los lisosomas no macroautofágicos respectivamente. Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición. Cada valor es la media de al menos cuatro experimentos diferentes con muestras por duplicado o por triplicado con una S.D. inferior al 2%.

proteínas a diferentes tiempos dentro de las 3 h siguientes (es decir a los tiempos 1-4 h y 9-12 h de caza, para analizar la degradación de todas las proteínas marcadas durante 15 min y de las proteínas de vida media larga marcadas durante ese pulso, respectivamente). En el análisis de la degradación de las proteínas, no utilizamos periodos de incubación más largos de 4 h para minimizar los posibles efectos secundarios de estos inhibidores.

En condiciones de crecimiento exponencial, en presencia o ausencia de suero, los proteasomas son responsables del 55-60% de la degradación, tanto del conjunto de proteínas marcadas durante 15 min como de las proteínas de vida media larga que se degradan a la vez que las proteínas de vida media corta. La degradación restante en condiciones de crecimiento exponencial se debe a lisosomas, (especialmente en ausencia de suero, donde hay un incremento de la macroautofagia que es aún más acentuado cuando se analizan sólo las proteínas de vida media larga) y a otras vías (no proteasomales y no lisosomales), cuya importancia disminuye en ausencia de suero.

En condiciones de confluencia, especialmente en células cultivadas en ausencia de suero, la contribución del proteasoma a la degradación de proteínas marcadas durante 15 min, disminuye ligeramente (40-50%) mientras que la contribución de los lisosomas aumenta hasta alcanzar casi el 50% en ausencia de suero. Las otras vías parecen funcionar igual o algo por debajo de su actividad en condiciones de crecimiento exponencial con suero.

La degradación de proteínas marcadas durante pulsos breves está compuesta por dos cinéticas que corresponden a la degradación de proteínas de vida media larga y a la de proteínas de vida media corta (Figura 15 y Tabla 4). Por tanto, para estimar la contribución de las diferentes vías proteolíticas a la degradación de proteínas de vida media corta, calculamos primero la cantidad de proteínas de vida media larga y de proteínas marcadas durante pulsos breves, que son degradadas por las diferentes vías proteolíticas en el periodo de 3 h que hemos analizado en esta Tesis (a partir de los datos de las Figuras 14 y 16 y de la Tabla 4) y después, por diferencia entre estos valores, obtenemos la cantidad de proteínas de vida media corta que se degradan por las diferentes vías (Figura 17A). A partir de estos valores es posible ahora calcular la contribución de las diferentes vías a la degradación de proteínas de vida media corta en las distintas condiciones de crecimiento (Figura 17B).

A la vista de los datos de la Figura 17B, podemos decir que los proteasomas contribuyen entre un 55-60% a la degradación de proteínas de vida media corta en condiciones de crecimiento exponencial y entre un 40-50% en condiciones de confluencia. Por otro lado, no hay degradación apreciable por macroautofagia de proteínas de vida media corta, ni siquiera en ausencia de suero. Por tanto, la inhibición de la 3-MA de la degradación de proteínas marcadas durante un pulso de 15 min (Figura 16A) se puede explicar por su efecto sobre la degradación de proteínas de vida media larga (Figura 16B) que contribuyen a la cinética de degradación tras un pulso breve. La participación de las vías lisosomales no macroautofágicas

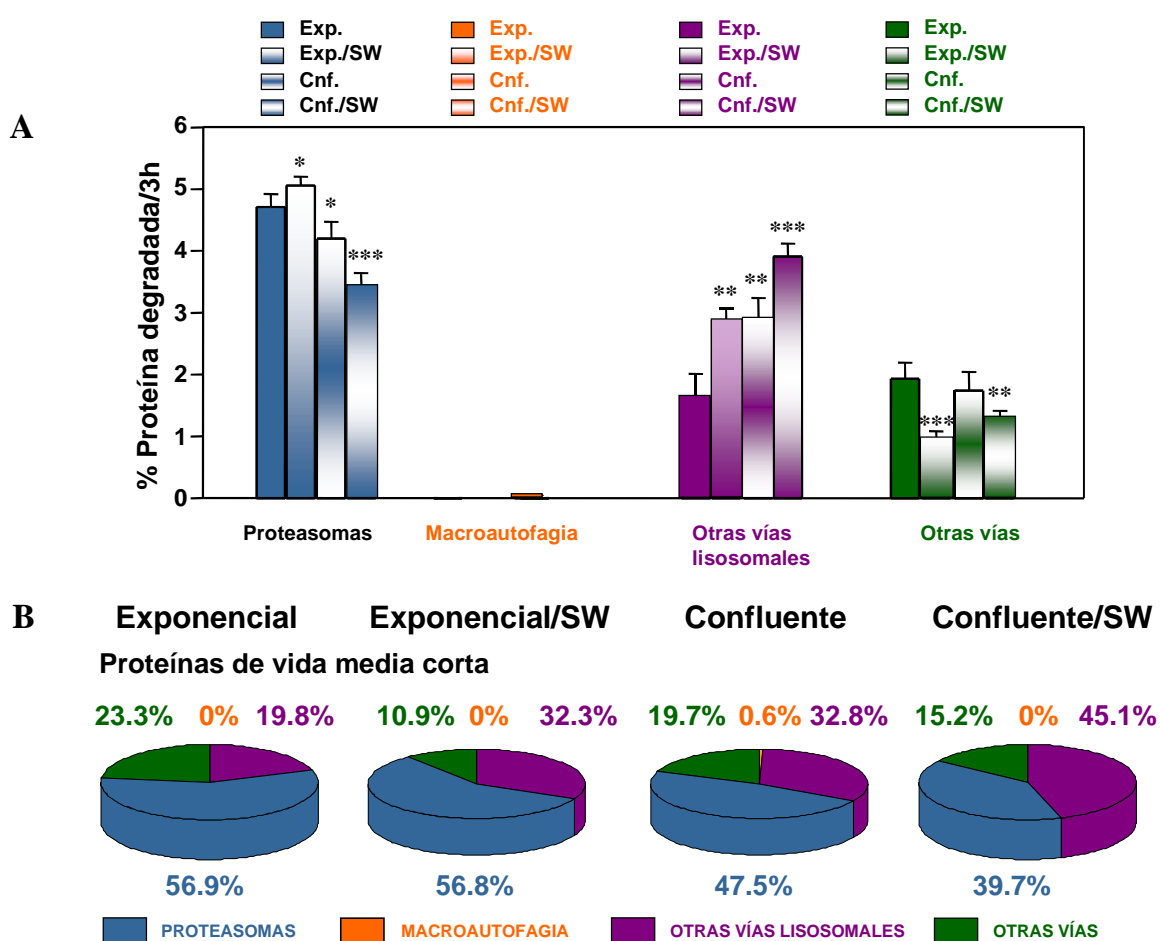


Figura 17. Contribución de los proteasomas, macroautofagia, vías lisosomales no macroautofágicas y otras vías a la degradación de proteínas de vida media corta en fibroblastos humanos en diferentes condiciones de crecimiento.

La contribución de diferentes vías proteolíticas (proteasomas, macroautofagia, otras vías lisosomales y otras vías no lisosomales y no proteasomas) se calcula como se describe en el texto. Los datos se muestran como porcentaje de proteína marcada cuya degradación es inhibida en 3 h (A) o como porcentaje de inhibición (B).

en la degradación de proteínas de vida media corta aumenta en ausencia de suero (desde un 20% a un 30%) y, especialmente, en condiciones de confluencia sin suero (hasta un 45%), en este caso de forma concomitante a la disminución de la contribución de los proteasomas (Figura 17B). Finalmente, otras vías no proteosomales y no lisosomales contribuyen en un 20% (en presencia de suero) y en un 10-15% (en ausencia de suero) a la degradación de estas proteínas.

2.3 Contribución de las principales vías proteolíticas a la degradación de proteínas de vida media larga

Las proteínas de vida media larga constituyen el conjunto de proteínas más abundantes en la célula. Por esta razón, decidimos analizar con más detalle la contribución de las diferentes vías proteolíticas a su degradación marcando durante un tiempo de pulso más prolongado (48 h) que aumentara la proporción de proteínas marcadas con vidas medias más largas.

2.3.1 Cinéticas de degradación de proteínas de vida media larga, marcadas radiactivamente durante 48 h en fibroblastos humanos en diferentes condiciones de crecimiento

En primer lugar, analizamos las velocidades de degradación de proteínas de vida media larga marcadas durante 48 h en fibroblastos humanos en las cuatro condiciones de crecimiento (ver Material y Métodos) que se muestran en la Figura 18. En todos los casos, la degradación seguía una cinética de primer orden (datos no mostrados) con una vida media aparente de 130 ± 7.5 h (exponencial), 117.5 ± 4.3 h (confluente), 63.0 ± 4.1 h (exponencial/SW) y 56.8 ± 2.8 h (confluente/SW) (todos los valores son media \pm S.D. de cinco experimentos diferentes). En cultivos confluentes en presencia de suero hay un incremento, ligero pero significativo ($P < 0.05$), en la velocidad de degradación de proteínas de vida media larga en comparación con los valores observados con células en crecimiento exponencial. La ausencia de suero (SW), tanto en células en crecimiento exponencial como confluentes, incrementa al menos dos veces la velocidad de degradación ($P < 0.005$). La proporción de proteínas de vida media más larga marcadas radiactivamente aumenta con un pulso más prolongado y eso conlleva un aumento en la vida media ponderada de este grupo de proteínas (ver Tabla 3) respecto a los valores

obtenidos en las diferentes condiciones con un pulso de 15 min (ver Tabla 4). Sin embargo, las variaciones en las cinéticas de degradación en cada condición de crecimiento (Tabla 5 valores entre paréntesis) se mantienen en su tendencia.

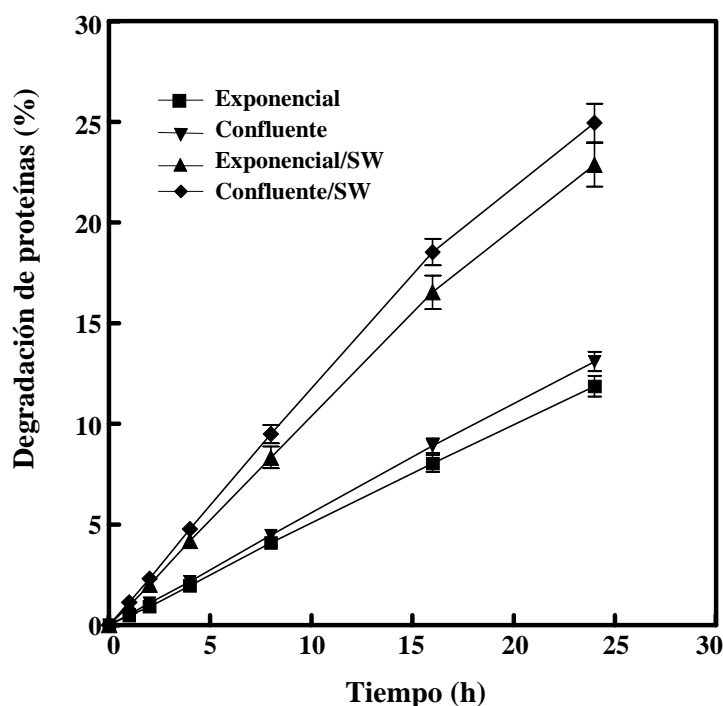


Figura 18. Cinéticas de degradación de proteínas de vida media larga en fibroblastos humanos en diferentes condiciones de crecimiento.

La degradación de proteínas a diferentes tiempos de caza se calculó a partir de la radiactividad liberada, soluble en ácido tricloroacético, de células previamente marcadas con L- ^3H]leucina como se describe en Material y Métodos. ■, crecimiento exponencial ($k_d=0.0053 \pm 0.0003 \text{ h}^{-1}$); ▼, fase confluyente ($k_d=0.0059 \pm 0.0002 \text{ h}^{-1}$); ▲, crecimiento exponencial sin suero (SW) ($k_d=0.0110 \pm 0.0007 \text{ h}^{-1}$); ◆, fase confluyente sin suero (SW) ($k_d=0.0122 \pm 0.0006 \text{ h}^{-1}$). Cada punto es la media \pm S.D. de cinco experimentos diferentes con muestras por duplicado. Las diferencias con los valores obtenidos en condiciones de crecimiento exponencial fueron significativas con $P < 0.05$ (confluyente) y $P < 0.0005$ (condiciones SW).

Tabla 5. Comparación de las vidas medias ($t_{1/2}$) de proteínas de vida media larga (L) en fibroblastos humanos marcados durante un pulso de 15 min o de 48 h con L- ^3H]leucina.

Condiciones de crecimiento	$t_{1/2L}$ (h) (pulso: 15 min)	$t_{1/2L}$ (h) (pulso: 48 h)
Exponencial	69.9 \pm 4.2 (100)	130.0 \pm 7.5 (100)
Exponencial/SW	45.0 \pm 3.6 (64.4)	63.0 \pm 4.1 (48.5)
Confluyente	60.8 \pm 4.4 (87.0)	117.5 \pm 4.3 (90.4)
Confluyente/SW	40.9 \pm 3.8 (58.5)	56.8 \pm 2.8 (43.7)

Los datos de vida media para el pulso de 15 min proceden de la Tabla 4 y para el pulso de 48 h de la Figura 18. Entre paréntesis se indica cada valor expresado como porcentaje respecto a crecimiento exponencial con suero.

2.3.2 Contribución de las principales vías proteolíticas a la degradación de proteínas de vida media larga, en fibroblastos humanos en diferentes condiciones de crecimiento

Cuando investigamos el efecto de los diferentes inhibidores sobre la degradación de proteínas de vida media larga bajo estas cuatro condiciones, encontramos claras diferencias (Figura 19).

En condiciones exponenciales y en presencia de suero, el 50-55% de las proteínas de vida media larga se degradaban por proteasomas (Figura 19A). Las proteínas restantes se degradaban por vías lisosomales no macroautofágicas (25-30%) y por otras vías no lisosomales ni proteasomales (15-20%).

En condiciones de confluencia con suero, la principal diferencia con las condiciones anteriores fue un aumento moderado en la actividad de las vías lisosomales no macroautofágicas (de 28.1% a 34.6%), lo que probablemente explica la degradación sensiblemente más alta que encontramos en estas condiciones (ver Figura 18), y un descenso moderado de la contribución de los proteasomas (de 53.5% a 47.6%). La contribución de las vías no proteasomales y no lisosomales a la degradación de proteínas, es aproximadamente la misma en condiciones exponenciales o confluentes con suero (18.4% y 17.8% respectivamente). En estas dos condiciones, no pudimos detectar inhibición alguna en la degradación de proteínas de vida media larga con la 3-MA. Incluso, la adición de este inhibidor parece aumentar la velocidad de degradación (entre un 1 y un 5%) de las proteínas de vida media larga, especialmente en células en crecimiento exponencial.

Cuando se retira el suero, tanto a células en crecimiento exponencial como confluyente, hay un incremento en la macroautofagia (de un 0% a un 40%). Ya que en estas condiciones la degradación de proteínas experimenta un incremento de aproximadamente un 100%, las variaciones en la actividad de las diferentes vías, cuando las comparamos con células incubadas en presencia de suero, son más claras presentando los datos como se muestra en la Figura 19B. A partir de ellos se puede calcular que la macroautofagia es responsable de alrededor del 80% de la degradación inducida por la retirada del suero del medio de cultivo. Aunque, debido al gran incremento de la macroautofagia, disminuye el porcentaje relativo de la degradación proteasomal de las proteínas de vida media larga en ausencia de suero (Figura 19A), la Figura

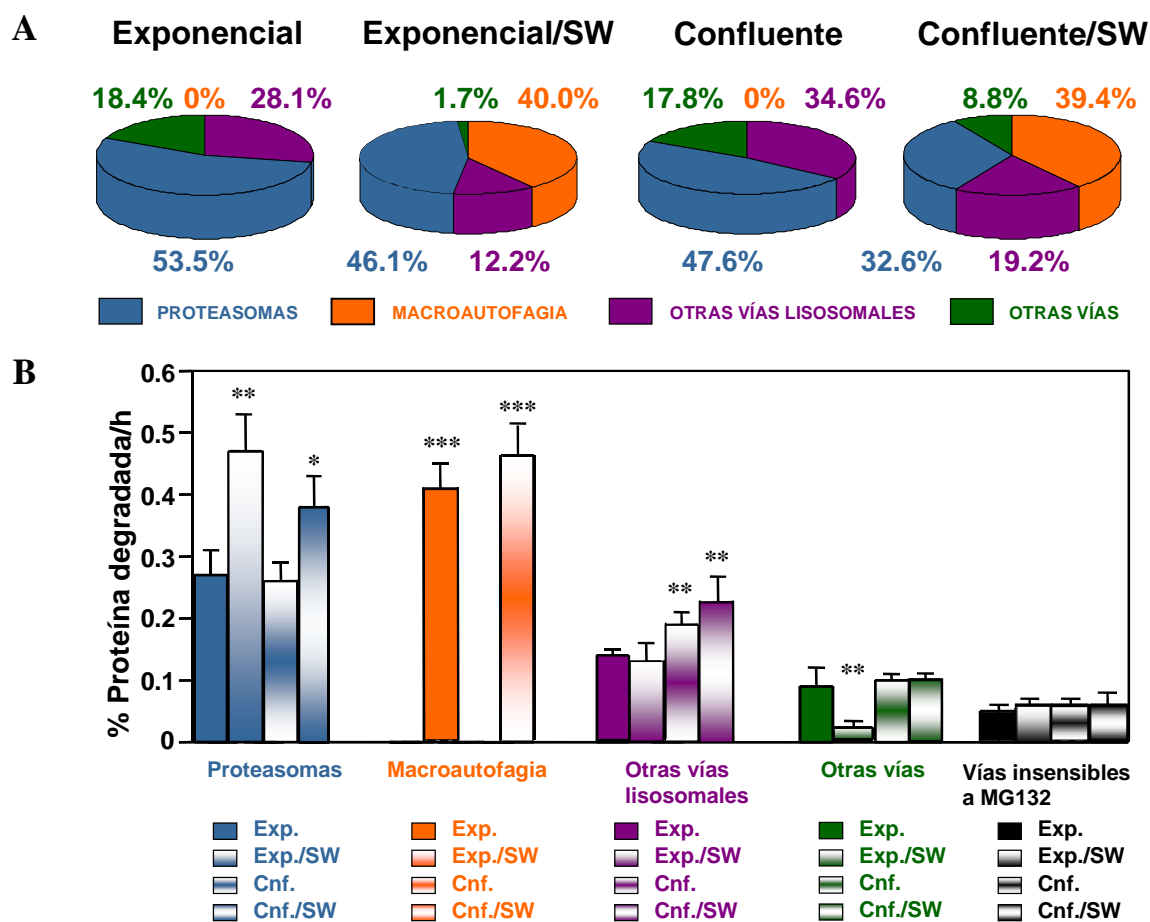


Figura 19. Contribución de las diferentes vías proteolíticas a la degradación de proteínas de vida media larga, en fibroblastos humanos en diferentes condiciones.

La contribución de los proteasomas, macroautofagia, otras vías lisosomales y otras vías no lisosomales (otras vías) se calculó como se describe en el texto, utilizando lactacistina para inhibir proteasomas, 3-MA para inhibir la macroautofagia y NH_4Cl + leupeptina para inhibir la macroautofagia y otras vías lisosomales, y se expresa como porcentaje de inhibición (A) o como porcentaje de la proteína marcada cuya degradación es inhibida por hora (B). Puesto que el MG132 inhibe a las vías lisosomales y a los proteasomas (ver Figura 10), la contribución de otras vías (no lisosomales y no proteosomales) también se calculó a partir del valor obtenido de la degradación que permanece después del tratamiento con este inhibidor (vías insensibles a MG132). Cada valor es la media \pm S.D. de, al menos, cuatro experimentos diferentes con muestras por duplicado. Las diferencias fueron significativas con $P < 0.05$, 0.005 y 0.0005 (*, ** y *** respectivamente).

19B muestra claramente que los proteasomas degradan muchas más proteínas en estas condiciones. De hecho, en células en crecimiento exponencial en ausencia de suero, se puede calcular que el 20% restante del incremento en la degradación de proteínas de vida media larga se debe a la actividad de los proteasomas (Figura 19B). Por el contrario, en cultivos confluentes privados de suero, el incremento en la degradación por proteasomas es menos marcado y aquí, pero no en células en crecimiento exponencial, las vías lisosomales no macroautofágicas también contribuyen al aumento de la degradación de proteínas producido por la retirada del

suero del medio de cultivo, como también ocurría con la degradación aumentada en ausencia de suero de las proteínas de vida media corta (ver Figura 17). Finalmente, la actividad degradativa de otras vías no proteasomales y no lisosomales (ver Figura 19B) es aproximadamente la misma (si esa contribución se evalúa considerando la degradación que permanece después del tratamiento con MG132, que, como ya dijimos, inhibe eficientemente las vías lisosomales y a los proteasomas), o es inhibida en condiciones de ausencia de suero en células exponenciales pero no en células confluentes (si esa contribución se obtiene calculando la degradación que permanece tras el tratamiento con lactacistina y NH_4Cl más leupeptina).

2.3.3 Cambios en los niveles de lisosomas y de proteasomas en fibroblastos humanos en diferentes condiciones de crecimiento

Para determinar si las variaciones observadas, en la contribución de los lisosomas a la degradación de proteínas en fibroblastos humanos, podían correlacionarse con cambios morfológicos en estos orgánulos, realizamos un análisis morfométrico de su volumen fraccional (Tabla 6) y examinamos su apariencia por microscopía electrónica (Figura 20) para cada condición de crecimiento.

Los lisosomas son algo más abundantes en células en confluencia, lo que es consistente con el incremento observado en la degradación lisosomal en esta condición (ver Figura 19A). Este incremento de los lisosomas es aún mayor en células privadas de suero, especialmente en confluencia. En la Tabla 6 se muestra que el incremento en el volumen de la fracción lisosomal concuerda con las variaciones producidas en la velocidad de recambio (ver Figura 18) y con la contribución de los lisosomas a la degradación de proteínas (ver Figura 19).

La morfología de los lisosomas también es diferente en presencia (Figura 20A y B) y en ausencia de suero (Figura 20C y D). En este último caso, los lisosomas son más grandes y su morfología corresponde a típicas vacuolas autofágicas que contienen material celular en diferentes estadios de degradación. La morfología de los lisosomas en ausencia de suero y en cultivos en confluencia confirma que, como ya sugerían los efectos de los inhibidores, los mecanismos lisosomales de degradación de proteínas que se activan en respuesta a distintas condiciones son diferentes: la macroautofagia se activa bajo condiciones de ausencia de suero y los mecanismos lisosomales diferentes a la macroautofagia son más activos en condiciones de confluencia tanto en presencia como en ausencia de suero.

Tabla 6. Efecto de las diferentes condiciones de crecimiento en fibroblastos humanos sobre el volumen fraccional de lisosomas.

Condiciones de crecimiento	Volumen de la fracción lisosomal (mm ³ / cm ³ citoplasma)	Velocidad de recambio (k _d) (h ⁻¹)	Degradación de proteínas por lisosomas (%)
Exponencial	35.6 ± 2.7 (100)	0.0053 (100)	28.1 (100)
Exponencial/SW	82.8 ± 8.4 (233)*	0.0110 (208)	52.2 (186)
Confluente	41.8 ± 3.4 (117)	0.0059 (111)	34.6 (123)
Confluente/SW	78.4 ± 6.6 (220)*	0.0122 (230)	58.6 (209)

Los resultados que se muestran son la media ± S.D. de tres experimentos diferentes, que se expresan como porcentaje (valores entre paréntesis) respecto al crecimiento exponencial. Estos valores se comparan con variaciones en la velocidad de recambio (k_d) de las proteínas de vida media larga (ver Figura 18) y con el porcentaje de degradación lisosomal en las diferentes condiciones (ver Figura 19). Las diferencias respecto a la condición de crecimiento exponencial fueron significativas con P < 0.005*.

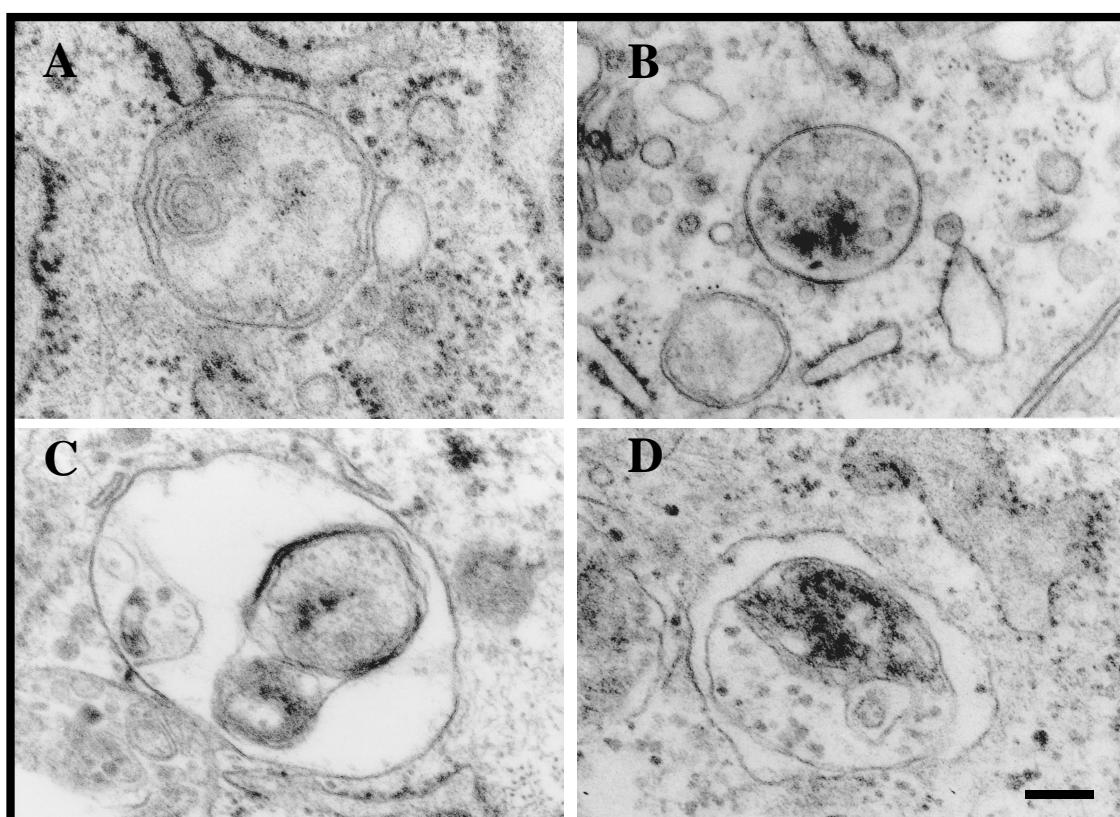


Figura 20. Apariencia en el microscopio electrónico de los lisosomas de fibroblastos humanos en diferentes condiciones de crecimiento.

Las micrografías muestran imágenes representativas de lisosomas típicos en células en crecimiento exponencial (A), confluyente (B) y exponencial y confluyente en ausencia de suero durante 4 h (C y D). Barra: 0.2 μm.

Para tratar, ahora, de explicar las variaciones observadas en la actividad de los proteasomas (Figura 19) de manera similar a como hemos hecho con lisosomas, examinamos el nivel de distintas subunidades que están presentes en los diferentes complejos de proteasomas, utilizando anticuerpos específicos (ver Material y Métodos).

Parece que, bajo las diferentes condiciones de crecimiento estudiadas, no hay cambio en los niveles de dos subunidades α (C9 y C8) del proteasoma 20S (Figura 21 y Tabla 7). Por el contrario, encontramos que en condiciones de confluencia, con o sin suero, hay un descenso

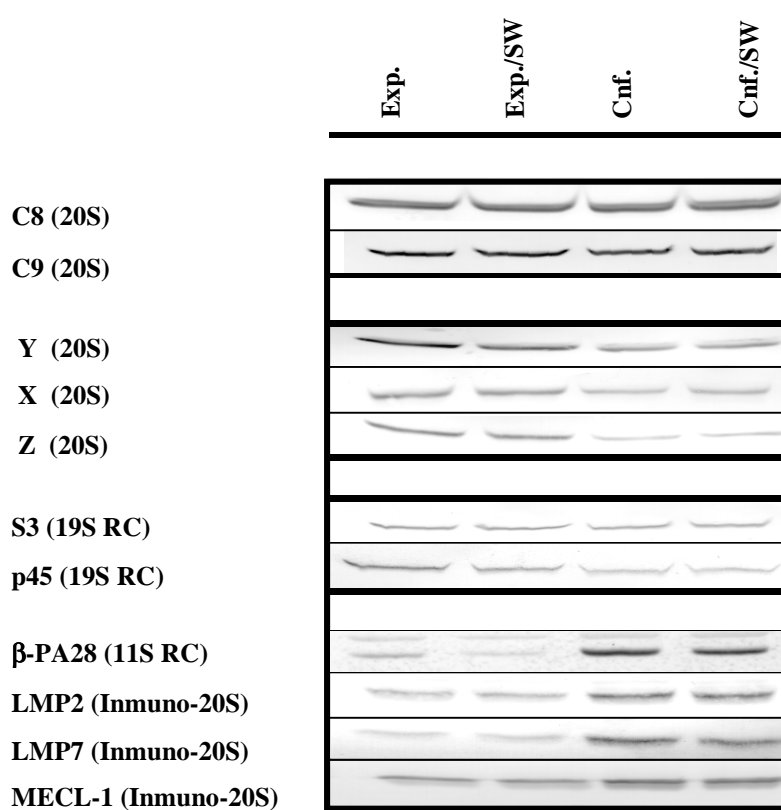


Figura 21. Niveles de diferentes subunidades de los proteasomas y de sus complejos reguladores en fibroblastos humanos en las distintas condiciones de crecimiento.

Extractos celulares totales (50 μ g de proteína) de fibroblastos humanos en crecimiento exponencial (exp.) o confluyente (cnf.), incubados en presencia o en ausencia de suero (SW) durante 4 h, se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS. A continuación, las preparaciones se inmunotransfirieron y las siguientes subunidades se detectaron con anticuerpos específicos contra: C8 y C9 (proteasoma 20S); S3 y p45 (complejo regulador 19S o 19S RC); β -PA28 (complejo regulador 11S u 11S RC); LMP2, LMP7 y MECL-1 (immunoproteasoma o inmuno-20S) e Y, X, Z (subunidades β del proteasoma 20S por las que se intercambian, LMP2, LMP7 y MECL-1, respectivamente). Los niveles relativos de las diferentes subunidades se determinaron por análisis densitométrico.

en los niveles de tres subunidades β (Y, X y Z) del proteasoma 20S y de dos subunidades (p45 y S3) del complejo regulador 19S que constituye el proteasoma 26S. También observamos un incremento en los niveles de cuatro subunidades: una del complejo regulador 11S (β -PA28) y tres del inmunoproteasoma (LMP2, LMP7 y MECL-1) que se intercambian, respectivamente, por las tres subunidades β analizadas (Tabla 7).

Tabla 7. Niveles relativos de diferentes subunidades del proteasoma y de sus complejos reguladores en fibroblastos humanos en diferentes condiciones de crecimiento.

Subunidad	Complejo	Exponencial	Exponencial SW	Confluyente	Confluyente SW
C8 (6)	20S	100	93 \pm 9	99 \pm 5	102 \pm 13
C9 (6)	20S	100	99 \pm 8	99 \pm 7	102 \pm 12
Y (4)	20S	100	96 \pm 18	75 \pm 18*	73 \pm 21*
X (3)	20S	100	92 \pm 8	55 \pm 26**	58 \pm 21*
Z (3)	20S	100	93 \pm 17	66 \pm 9***	59 \pm 7**
p45 (6)	19S RC	100	95 \pm 8	69 \pm 9***	77 \pm 10**
S3 (6)	19S RC	100	93 \pm 10	72 \pm 11**	81 \pm 11*
β -PA28 (6)	PA28 RC	100	90 \pm 12	222 \pm 32***	236 \pm 30***
LMP2 (6)	Inmuno-20S	100	90 \pm 12	208 \pm 38***	210 \pm 35***
LMP7 (4)	Inmuno-20S	100	103 \pm 27	265 \pm 61***	246 \pm 64***
MECL-1 (3)	Inmuno-20S	100	108 \pm 10	237 \pm 77*	238 \pm 77**

El porcentaje de cada subunidad, en las diferentes condiciones, se determinó por la cuantificación de inmunotransferencias en las que se analizaron cantidades iguales de proteína y se revelaron utilizando anticuerpos específicos primarios y segundos anticuerpos conjugados a fosfatasa alcalina. El número de preparaciones, analizadas como se describe en Material y Métodos, se indica entre paréntesis detrás de la subunidad correspondiente. Los datos se expresan como porcentaje de la absorbancia total en células en crecimiento exponencial. Las diferencias significativas respecto a C8 con una $P < 0.05$, 0.005 y 0.0005 se representan, respectivamente, con *, **, ***. SW: ausencia de suero.

Estos resultados podrían explicar el descenso de actividad de los proteasomas en condiciones de confluencia, especialmente en ausencia de suero (ver Figura 19A), ya que el proteasoma 26S está implicado en la degradación de proteínas ubiquitiladas mientras que el proteasoma PA28 y los inmunoproteasomas parecen implicados en la generación de péptidos para la presentación de antígenos. Sin embargo, el gran incremento en la degradación de proteínas por proteasomas observado en ausencia de suero, especialmente en células en crecimiento exponencial (ver Figura 19B), no puede explicarse por cambios en los niveles de proteasomas o de sus complejos (ver Figura 21 y Tabla 7). Por lo tanto, razonamos que este incremento se podría deber a cambios en las proteínas sustrato, que las vuelvan más susceptibles a la degradación por el sistema proteasoma dependiente de ubiquitina.

Esta suposición se confirmó cuando investigamos la cantidad de proteínas ubiquitiladas por inmunotransferencia (Figura 22) utilizando anticuerpos que las reconocen (ver Material y Métodos). En esos experimentos encontramos que se incrementaba la cantidad de dichas proteínas en células en crecimiento exponencial en ausencia de suero (Exp./SW) cuando se inhibía el proteasoma.

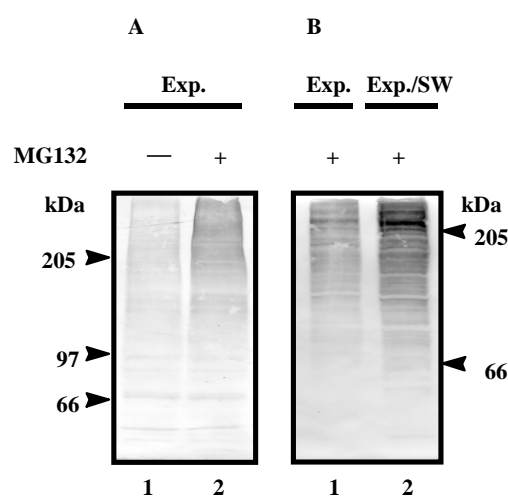


Figura 22. Niveles de proteínas ubiquitiladas en células en crecimiento exponencial, incubadas durante 4 h en presencia o en ausencia de suero.

(A) Extractos de proteínas (45 μ g) de células en crecimiento exponencial con suero, tratadas (línea 2) o no (línea 1) durante 4 h con MG132 (50 μ M), se analizaron por inmunotransferencia con un anticuerpo que reconoce proteínas ubiquitiladas. **(B)** Experimento similar al que se muestra en el panel A, pero mostrando sólo células tratadas con MG132 para facilitar las comparaciones de los niveles de ubiquitinación en células en crecimiento exponencial incubadas con (línea 1) o sin (línea 2) suero durante 4 h. A y B muestran geles de poliacrilamida del 6 y del 8%, respectivamente.

2.3.4 Contribución de las diferentes vías proteolíticas a la degradación intracelular de proteínas de vida media larga en fibroblastos humanos en ayuno prolongado

Nuestro grupo investigador viene prestando especial atención a una vía lisosomal no macroautofágica, la autofagia mediada por chaperonas. Puesto que se cree que en células en confluencia, el ayuno prolongado activa la degradación de proteínas por esta vía (Dice, 2000), comparamos la contribución de las diferentes vías analizadas anteriormente (Figura 23) en la degradación de proteínas en cultivos confluentes sometidos a privación de suero durante 0-4 h (confluente/SW, valores que se representaron en la Figura 19) y durante 24-28 h (ayuno prolongado).

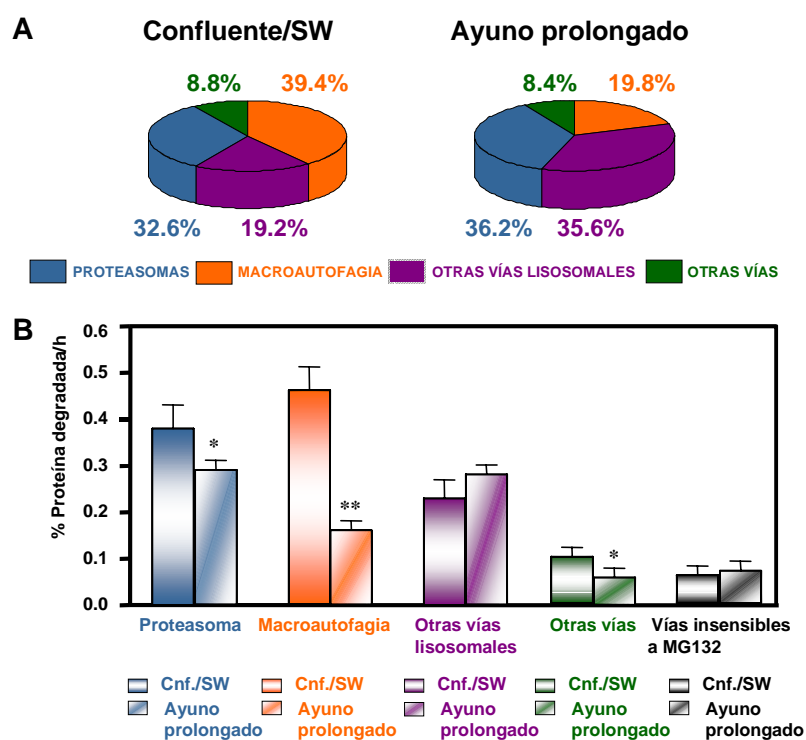


Figura 23. Contribución de las diferentes vías proteolíticas a la degradación de proteínas de vida media larga en fibroblastos humanos confluentes sometidos a privación de suero durante 0-4 h (confluente/SW) o 24-28 h (ayuno prolongado). La contribución de los proteasomas, macroautofagia, otras vías lisosomales no macroautofágicas y otras vías no lisosomales ni proteasomales (otras vías) se calcularon como se describe en la Figura 19. Los valores se muestran como porcentaje de inhibición (**A**) o como porcentaje de la proteína marcada cuya degradación es inhibida por hora (**B**). Cada valor es la media \pm S.D. de, al menos, cuatro experimentos diferentes con muestras por duplicado. Las diferencias fueron significativas con $P < 0.05$ y 0.005 (* y **, respectivamente).

El ayuno prolongado reduce al 70% la degradación observada durante las cuatro primeras horas de ausencia de suero (confluente/SW). Como se muestra en la Figura 23B, esta disminución en la cantidad de proteína degradada en el ayuno prolongado se debe, principalmente, a un gran descenso en la degradación de proteínas por macroautofagia. El porcentaje de proteína degradada por proteasomas también decrece (ver Figura 23B), pero mucho menos. De hecho, el porcentaje de inhibición de esta vía experimenta un incremento (ver Figura 23A).

Cuando analizamos los niveles de las diferentes subunidades del proteasoma (Tabla 8), no encontramos diferencias significativas en el ayuno prolongado respecto a los niveles encontrados (ya descritos en la Tabla 7) en confluencia/SW. También, la contribución a la degradación de las vías no proteasomales y no lisosomales o desciende sensiblemente o no se ve afectada por el ayuno prolongado.

Tabla 8. Niveles relativos de diferentes subunidades de los proteasomas en fibroblastos humanos en ayuno prolongado frente a los niveles en confluencia sin suero (valores de la Tabla 7).

Subunidad	Complejo	Confluente SW	Ayuno prolongado
C8 (6)	20S	102 ± 13	101 ± 12
C9 (6)	20S	102 ± 12	105 ± 2
Y (4)	20S	73 ± 21*	63 ± 23*
X (3)	20S	58 ± 21*	66 ± 11**
Z (3)	20S	59 ± 7**	56 ± 23*
p45 (6)	19S RC	77 ± 10**	77 ± 8**
S3 (6)	19S RC	81 ± 11*	77 ± 12*
β-PA28 (6)	PA28 RC	236 ± 30***	230 ± 60***
LMP2 (6)	Inmuno-20S	210 ± 35***	232 ± 41***
LMP7 (4)	Inmuno-20S	246 ± 64***	238 ± 28***
MECL-1 (3)	Inmuno-20S	238 ± 77**	228 ± 30***

El porcentaje de cada subunidad, en las diferentes condiciones, se determinó por la cuantificación de inmunotransferencias para las que se analizaron cantidades iguales de proteína y se revelaron utilizando anticuerpos específicos primarios y segundos anticuerpos conjugados a fosfatasa alcalina. El número de preparaciones analizadas, como se describe en Material y Métodos, se indican entre paréntesis detrás de la subunidad. Los datos se expresan como porcentaje de la absorbancia total en células en crecimiento exponencial. Las diferencias significativas respecto a C8 con una $P < 0.05$, 0.005 y 0.0005 se representan, respectivamente, con *, **, ***. No se encuentran diferencias significativas para los niveles de cada subunidad en ayuno prolongado frente a los niveles en confluencia sin suero.

Por el contrario, la importancia relativa de las vías lisosomales no macroautofágicas aumenta de 19.2 % durante las cuatro primeras horas de ausencia de suero a 35.6 % durante el mismo periodo en ayuno prolongado (ver Figura 23A).

Esta variación en la contribución de las vías lisosomales se correlacionó con la apariencia de los lisosomas al microscopio electrónico. En condiciones de ayuno prolongado

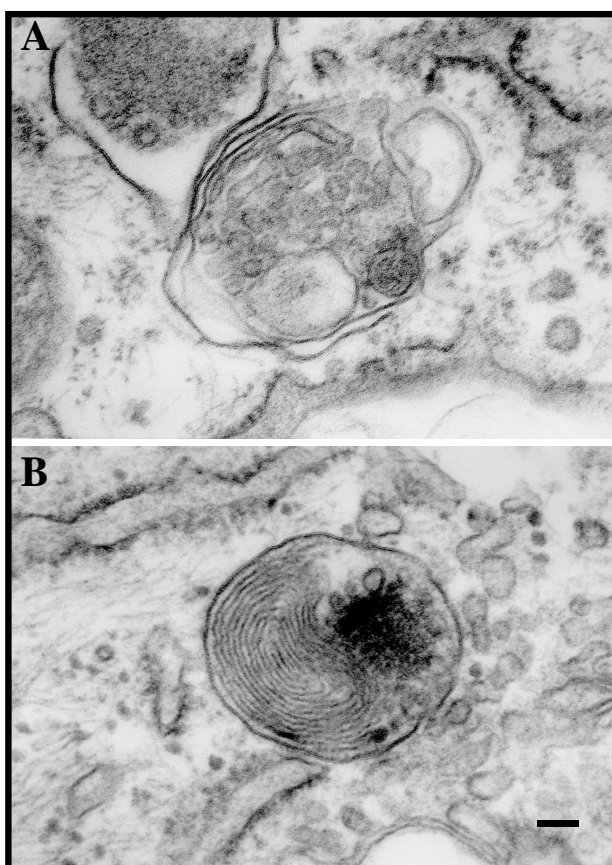


Figura 24. Apariencia al microscopio electrónico de los lisosomas en fibroblastos sometidos a ayuno prolongado.

Micrografías electrónicas representativas mostrando la apariencia de los lisosomas en fibroblastos humanos sometidos a ayuno prolongado (24-28h). **(A)** vacuola autofágica y **(B)** cuerpo residual con acumulación de restos de membranas. Barra: 0.1 μm

(Figura 24) esa apariencia es similar a la que se observa en las células confluentes en ausencia de suero durante 4 h (ver Figura 22D), pero las vacuolas autofágicas (Figura 24A) son menos abundantes y más pequeñas (nótese que la barra de escala en las Figuras 22D y 24 corresponden a 0.2 y 0.1 μm respectivamente) y son frecuentes los lisosomas que parecen cuerpos residuales y que contienen abundantes restos de membranas (Figura 24B). El volumen fraccional de lisosomas en células confluentes en ayuno de 28 h es de $51.2 \pm 4.5 \text{ mm}^3/\text{cm}^3$ que corresponde al 65% del volumen fraccional de lisosomas en células en confluencia sin suero durante 4 h (ver Tabla 6), lo que está en buena correlación con la bajada al 70% que observamos en la velocidad de recambio de las proteínas.

2.3.5 Contribución de las diferentes vías proteolíticas a la degradación intracelular de proteínas de vida media larga en fibroblastos humanos en ausencia de aminoácidos

Los aminoácidos son reguladores clave en la proteólisis intracelular (Blommaert *et al.*, 1997) y, por tanto, para obtener información sobre la capacidad de cada vía proteolítica en condiciones extremas de proteólisis (ausencia de suero y de aminoácidos), reemplazamos el medio MEM por un medio salino sin aminoácidos, el de Krebs-Henseleit (ver Material y Métodos). Tras 4 h de incubación comprobamos la viabilidad de las células con el colorante Trypan Blue, siendo ésta en todos los casos mayor del 95%. Durante este periodo las velocidades de recambio (k_d) fueron de $0.0113 \pm 0.0011 \text{ h}^{-1}$ (crecimiento exponencial), $0.0180 \pm 0.0019 \text{ h}^{-1}$ (crecimiento exponencial/SW), $0.0091 \pm 0.0003 \text{ h}^{-1}$ (confluencia), $0.0139 \pm 0.0005 \text{ h}^{-1}$ (confluencia/SW) y $0.0102 \pm 0.0008 \text{ h}^{-1}$ (ayuno prolongado). Estos valores son media \pm S.D. de cuatro experimentos diferentes y, en todos los casos excepto en ayuno prolongado, fueron significativamente diferentes respecto a los valores de células en crecimiento exponencial con una $P < 0.05$ o inferior. Estos valores de k_d , comparados con los obtenidos en presencia de aminoácidos (ver Tabla 7, segunda columna), representan un notable aumento en la velocidad de degradación, sobre todo en el caso de las células en crecimiento exponencial.

Estudiamos también, en condiciones de ausencia de aminoácidos, el efecto de los inhibidores que hemos descrito anteriormente. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 25. A diferencia de lo que observamos en presencia de aminoácidos, en todas las condiciones los lisosomas (macroautofagia más otras vías lisosomales) desempeñan un papel más importante que los proteasomas en la degradación de proteínas. La ausencia de aminoácidos incrementa la macroautofagia en todas las condiciones y, aunque en menor medida, también la actividad de los proteasomas (únicamente en crecimiento exponencial) y de otras vías no proteasomales y no lisosomales (en confluencia). Como en presencia de aminoácidos (ver Figura 19), los proteasomas degradan más proteínas en células en crecimiento exponencial sin suero. Sin embargo, en condiciones de confluencia su contribución disminuye (de un 34-36% en células en crecimiento exponencial a un 9-16% en confluencia en las tres situaciones de presencia de suero, privación de suero durante 0-4 h y

privación de suero durante 24-28 h) de forma bastante más marcada que en presencia de aminoácidos (ver Figura 25A).

En la Figura 25B se muestra la cantidad de proteínas degradadas por las diferentes vías proteolíticas en las distintas situaciones. Esto pone de manifiesto los cambios que se producen en la actividad de las diferentes vías en células en diferentes situaciones comparados con células en crecimiento exponencial. Observamos, como en presencia de aminoácidos (ver Figura 19B), un gran incremento de la macroautofagia en ausencia de suero y un incremento moderado en la actividad de las vías lisosomales no macroautofágicas en confluencia. Por otro lado, se produce un claro descenso en la actividad de los proteasomas en confluencia. En ayuno prolongado lo más manifiesto es, como en presencia de aminoácidos (ver Figura 19B), un

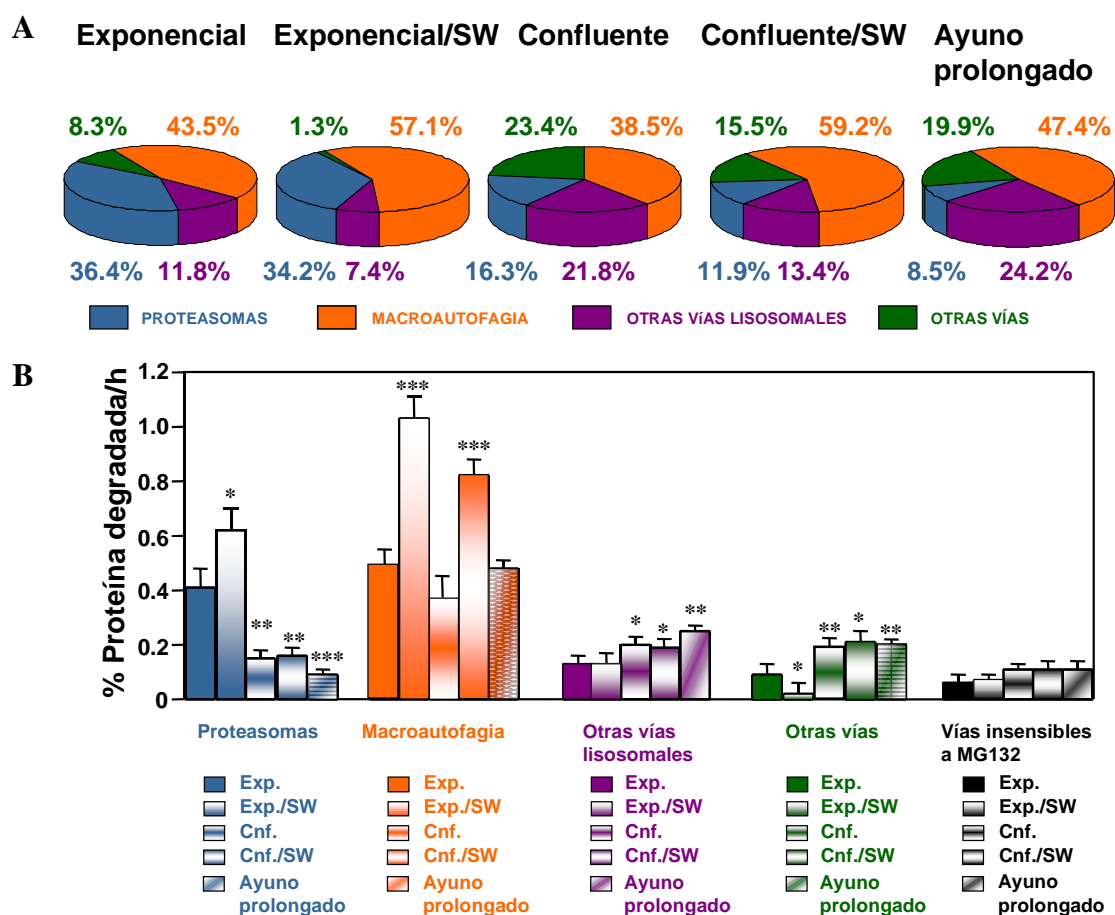


Figura 25. Contribución de las diferentes vías proteolíticas a la degradación de proteínas de vida media larga, en fibroblastos humanos en ausencia de aminoácidos.

Los experimentos y cálculos se realizaron como se describe en la leyenda de la Figura 19, pero en ausencia de aminoácidos. Cada valor es la media \pm S.D. de cuatro experimentos diferentes con muestras por duplicado. Las diferencias fueron significativas con $P < 0.05$, 0.005 y 0.0005 (*, ** y ***, respectivamente).

descenso de la macroautofagia y un aumento de las vías lisosomales no macroautofágicas. Además, las vías no proteasomales y no lisosomales se inhiben en células en crecimiento exponencial en ausencia de suero y, al igual que en presencia de aminoácidos (ver Figura 19B), las vías insensibles a MG132 no presentan diferencias significativas.

En definitiva pues, la ausencia de aminoácidos pone de manifiesto, de manera aún más clara, las diferencias ya observadas en presencia de los mismos en la actividad de las distintas vías proteolíticas en las diversas condiciones de crecimiento celular.

3. ESTUDIO DE LA IMPLICACIÓN DEL PROTEASOMA Y DE OTRAS VÍAS PROTEOLÍTICAS EN LA DEGRADACIÓN DE UNA PROTEÍNA ESPECÍFICA DE MEMBRANA PLASMÁTICA: EL RECEPTOR DE LDL

Se sabe que defectos en el gen que codifica para el receptor de LDL (Goldstein *et al.*, 1995) son causa de una enfermedad autosómica dominante, la Hipercolesterolemia Familiar (HF). La HF fue la primera enfermedad genética reconocida como causante de infarto de miocardio y su elevada frecuencia de aparición la coloca entre las enfermedades monogénicas más comunes de los humanos. Una de las mutaciones más frecuentes en población española, que se encuentra localizada en el segundo dominio (ver Introducción) del receptor de LDL, es la mutación C358Y. Ésta consiste en un cambio G→A en el nucleótido 1,149 localizado en el exón 8, que provoca la sustitución del aminoácido Cys 358 por Tyr (Puig, 1996). El residuo de Cys sustituido forma parte de la repetición B del dominio del receptor que presenta homología con el factor de crecimiento epidérmico (EGF). Esta secuencia se encuentra altamente conservada en diversos dominios homólogos de otras proteínas. En el caso del receptor de LDL se ha adjudicado a este dominio dos funciones. Por un lado, una función estructural, ya que permite la correcta exposición del dominio de unión de LDL al medio extracelular. Por otro lado, una función reguladora, pues permite la liberación de las LDL en el endosoma, una vez internalizadas, y el reciclado del receptor a la membrana plasmática.

Conviene señalar que el retículo es el lugar donde ocurre el plegamiento y la maduración de muchas proteínas y también donde se detectan las proteínas mal plegadas o innecesarias que una vez retornan al citosol son degradadas por el proteasoma mediante vías dependientes e independientes de ubiquitina (Sommer y Wolf, 1997, Roberts, 1997). Esto unido al hecho de que, según ensayos preliminares (Puig, 1996), esta mutación podría afectar a la maduración del receptor de LDL nos llevó a estudiar la posible implicación del proteasoma en la degradación del receptor de LDL. De confirmarse esa implicación, el receptor de LDL, podría utilizarse como proteína modelo para estudiar la degradación de proteínas en tránsito por el retículo endoplásmico y que salen al citosol para ser degradadas. Asimismo, y como corolario del apartado anterior pretendemos investigar los mecanismos que operan en la

degradación de proteínas específicas. Puesto que las vías de degradación del receptor de LDL no se han establecido aún claramente, y teniendo en cuenta además, la importancia de esta proteína en una patología tan importante como la HF, decidimos abordar este estudio.

El tercer objetivo de esta Tesis Doctoral se centró pues en analizar la degradación del receptor de LDL y del efecto de la mutación C358Y sobre las vías degradativas de la forma precursora y de la forma madura del receptor de LDL.

3.1 Transfecciones permanentes de células CHO *ldlA7*

Debido a la dificultad para disponer de fibroblastos humanos portadores de la mutación C358Y, la primera aproximación experimental fue obtener líneas celulares que expresaran el receptor humano de LDL, mediante transfección de células eucariotas con el ADN complementario o copia del receptor mutante, obtenido por mutagénesis dirigida (Puig, 1996), y del receptor silvestre.

Para la realización de este estudio se han empleado células CHO *ldlA7*, ya que presentan un receptor endógeno no funcional debido a una mutación que impide el procesamiento de la forma precursora a la forma madura (Kozarsky *et al.*, 1986).

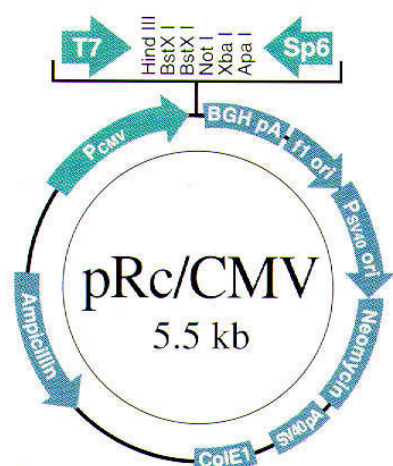


Figura 26. Vector de expresión en células eucariotas pRc/CMV, empleado en estos estudios.

El vector de expresión empleado en la transfección, el pRc/CMV (Figura 26), presenta una serie de características que le hacen idóneo para la expresión constitutiva del gen del receptor de LDL insertado. Posee las secuencias que permiten su crecimiento y mantenimiento en *E. coli* (resistencia a ampicilina), así como el gen de resistencia a neomicina, lo que permite seleccionar aquellas células que han incorporado el plásmido y que, por tanto, son resistentes a G418 (geneticina).

Otra característica importante del pRc/CMV es que presenta el origen de replicación de SV40, lo que permite la replicación episomal del plásmido en líneas celulares que expresan el antígeno mayor T de SV40 (tales como las líneas celulares COS-1 o COS-7). Presenta una secuencia promotora del gen inmediatamente temprano del citomegalovirus humano (CMV), lo que permite una transcripción constitutiva del ADN copia insertado en el genoma de la célula. Por último, presenta señales de poliadenilación y de terminación de la transcripción del gen de la hormona de crecimiento bovina, lo que incrementa la estabilidad del transcrito del ADN copia insertado.

Los ADN copias que codifican la forma silvestre y la mutación C358Y, este último obtenido por mutagénesis dirigida (Puig, 1996), del receptor humano de LDL se subclonaron en este vector de expresión siguiendo la misma estrategia de clonación (ver Material y Métodos), ya que el pC358Y que se había obtenido presentaba los mismos sitios de restricción que el vector de expresión pRc/CMV. Los plásmidos así obtenidos se denominaron pCMVLDLR y pCMVC358Y, respectivamente.

El procedimiento de transfección permanente empleado fue el método del fosfato cálcico seguido de la posterior selección (ver Material y Métodos). Mediante este método se pretende que las células incorporen establemente el ADN exógeno en su propio genoma, y expresen la proteína codificada por él de forma constitutiva. Una vez realizado el ensayo de transfección, se dejaron crecer las células y, cuando el cultivo alcanzó la confluencia, se tripsinizaron, sembrándose en nuevas placas a una densidad celular baja. Se añadió el agente de selección que, en nuestro caso, es la geneticina y, con el tiempo, las células que no habían incorporado el ADN plasmídico murieron y sólo crecieron aquellas que expresaban el gen de resistencia a la geneticina.

Se realizaron tres transfecciones, con los plásmidos pRc/CMV (plásmido vacío), pCMVLDLR y pCMVC358Y. Tras sembrar varias placas de cada una de ellos, se obtuvieron de 5 a 10 colonias por transfección. Las colonias obtenidas transfectando con pRc/CMV, que crecían y eran resistentes a la geneticina, no se sometieron a más análisis. En el caso de las transfecciones con los plásmidos pCMVLDLR y pCMVC358Y, se seleccionaron además aquellas colonias que expresaban el receptor de LDL y se subclonaron por dilución límite (ver

Material y Métodos). De esta manera, se establecieron las líneas celulares CHO *ldlA7* / pRc/CMV (a la que denominaremos a partir de ahora CHO-mock), CHO-hLDLR y CHO-C358Y.

3.1.1 Análisis de la expresión del receptor transfectado permanentemente en células CHO *ldlA7*

Como comprobación de la eficacia en la transfección permanente del receptor humano de LDL, se obtuvieron en primer lugar, a partir de las tres líneas establecidas, extractos de proteínas con los que se realizaron inmunotransferencias e incubaciones con un anticuerpo policlonal obtenido contra el receptor de LDL y que reconoce a la proteína desnaturizada (ver Material y Métodos). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 27: en las células CHO-hLDLR y CHO-C358Y, el anticuerpo reconoce una banda mayoritaria cuya movilidad electroforética coincide con la del receptor de LDL y una banda de mayor movilidad que corresponde al precursor (ver apartado 3.1.2), mientras que en las células no transfectadas aparece una tenue banda que corresponde a su propio receptor. Estos resultados permiten concluir que las células transfectadas con los plásmidos pCMVLDLR y pCMVC358Y han integrado el ADN exógeno y expresan el receptor humano de LDL, silvestre o mutante, de forma constitutiva.

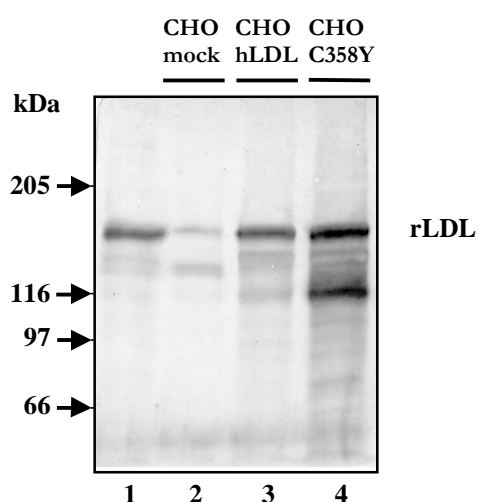


Figura 27. Inmunotransferencia para comprobar la expresión del receptor de LDL en las líneas establecidas por transfección estable de células CHO *ldlA7*.

Los extractos celulares (50 µg de proteína total por carril) de CHO-mock (carril 2), CHO-hLDLR (carril 3) y CHO-C358Y (carril 4) se sometieron a electroforesis en condiciones reductoras y posterior transferencia a una membrana de nitrocelulosa e incubación con el anticuerpo policlonal contra el receptor de LDL. Como control, en el carril 1 se empleó extracto de proteínas de córtex adrenal bovino (40 µg de proteína).

3.1.2 Análisis de la expresión del receptor de LDL en las células transfectadas establemente por inmunoprecipitación

Para comprobar la expresión en las células transfectadas del receptor de LDL, se realizaron experimentos de pulso y caza con las tres líneas celulares obtenidas. Tras un pulso de 2 h con ^{35}S -Met, se recogieron células a tiempos de caza de 0 y 1.5 h. Se obtuvieron extractos celulares de las diferentes muestras a los que se sometió a inmunoprecipitación selectiva del receptor de LDL con el anticuerpo policlonal obtenido contra el mismo (ver Material y Métodos). Los resultados se presentan en la Figura 28.

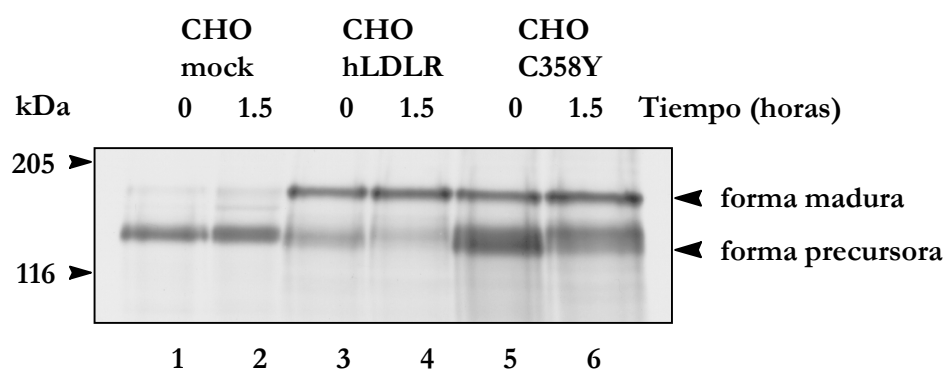


Figura 28. Inmunoprecipitación del receptor de LDL en las líneas celulares transfectadas establemente.

Ensayos de pulso (2 h) y caza (a los tiempos indicados) en las líneas celulares CHO-mock, CHO-hLDLR y CHO-C358Y y posterior inmunoprecipitación del receptor de LDL (LDLR) silvestre (carriles 3 y 4) y mutante (carriles 5 y 6). Como control se muestra la inmunoprecipitación del receptor de LDL de las células CHO-mock (carriles 1 y 2).

En las células transfectadas con el receptor silvestre (carriles 3 y 4) aparece más destacada una banda que presenta una movilidad electroforética que corresponde a la de la forma madura del receptor de LDL, mientras que la forma precursora del receptor apenas es manifiesta, sobre todo tras 1.5 h de caza (carril 4).

En las células CHO-mock (Figura 28, carriles 1 y 2) se puede observar una banda que corresponde a la forma precursora endógena de estas células y una tenue banda a la altura de la forma madura del receptor de LDL. Esto se debe a que estas células presentan una mutación

que impide, aunque no totalmente, el procesamiento del receptor de LDL endógeno a forma madura.

En las células transfectadas con el receptor mutante, se puede apreciar cómo a tiempo 0 (Figura 28, carril 5) la banda correspondiente a la forma madura del receptor es menos intensa que la del precursor, indicando que existe una acumulación de este último. Es de señalar que tras 1.5 h de caza (carril 6) la banda de proteína madura es más intensa que a tiempo 0, aunque en comparación con las células transfectadas con el receptor silvestre (carril 4), sigue habiendo una cantidad apreciable de formas precursoras. Por tanto, parece que la mutación C358Y produce un retraso en el transporte y procesamiento post-traducciona del precursor a proteína madura.

3.1.3 Análisis de la funcionalidad del receptor transfectado por inmunofluorescencia directa asociada a ligando

Mediante microscopía de fluorescencia es posible visualizar la interacción de un receptor de membrana plasmática con su ligando marcado con una sonda fluorescente y, si ocurre, la internalización de este ligando. Con el fin de determinar que todas las células de la línea establecida CHO-hLDLR expresaban el receptor de LDL y que éste era funcional (es decir, que reconoce e internaliza las partículas de LDL), se realizaron ensayos de unión e internalización de conjugados de DiI-LDL. El DiI (1,1'-dioctadecil-3,3',3'-tetrametilindocarbocianina) es un compuesto fluorescente lipofílico que se une, fuerte y estequiométricamente, a las partículas de LDL, sin que esta unión altere la interacción de las mismas con su receptor. Estos mismos ensayos se realizaron también con las líneas celulares CHO-mock y CHO-C358Y.

En estos ensayos se cultivaron las células CHO-mock, CHO-hLDLR y CHO-C358Y sobre cubreobjetos y se incubaron 3 h con el conjugado DiI-LDL a 37°C (ver Material y Métodos) y se montaron sobre portaobjetos para su observación en un microscopio de fluorescencia. En la Figura 29 se puede apreciar que las células CHO-hLDLR y CHO-C358Y expresan un receptor funcional de LDL, ya que todas las células presentes en el campo (Figura 29, paneles A y D) unen e internalizan los conjugados DiI-LDL (paneles B y E). Para

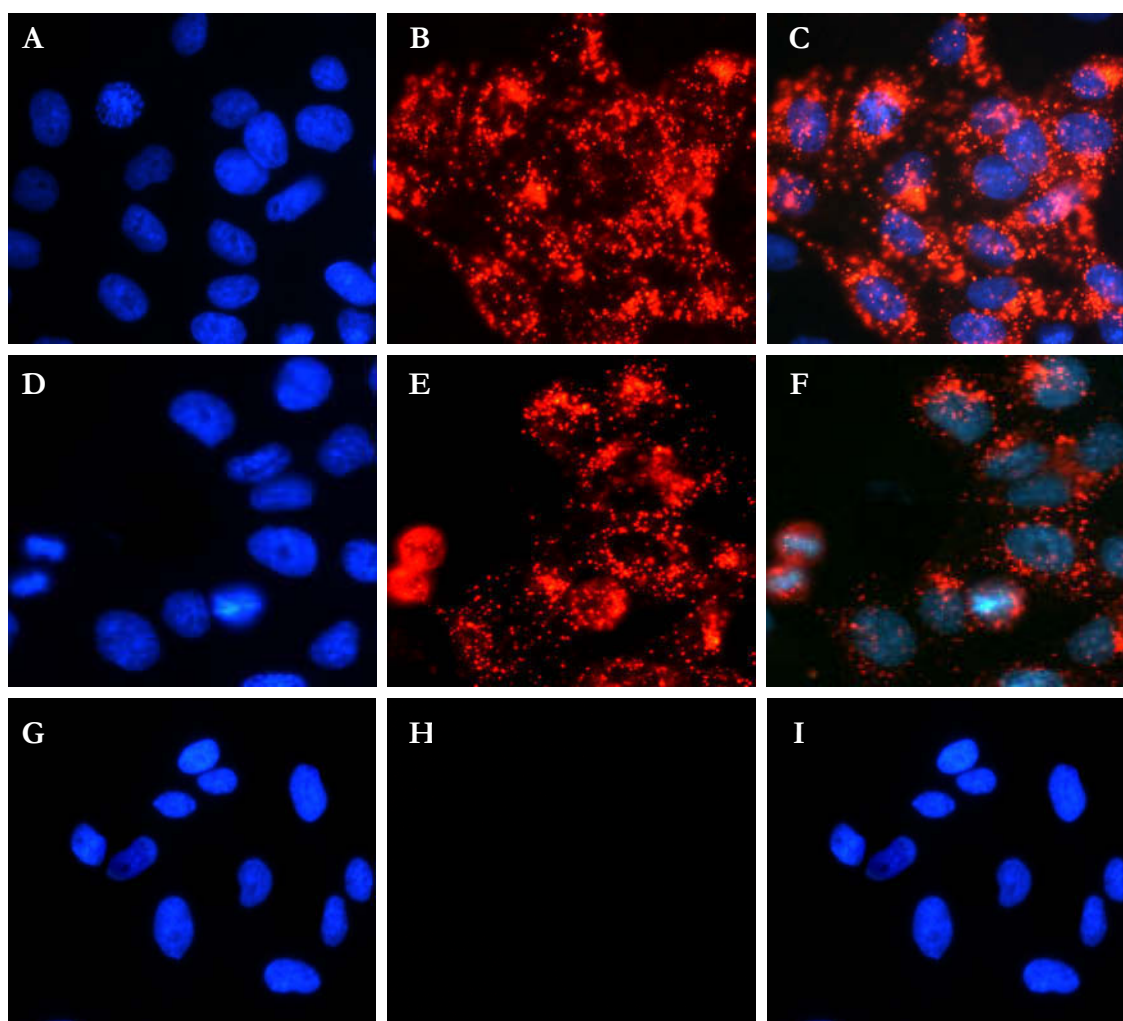


Figura 29. Ensayos de unión e internalización de LDL conjugada con DiI por las líneas celulares transfectadas establemente.

Las células CHO-hLDLR, CHO-C358Y y CHO-mock (paneles **B**, **E** y **H** respectivamente) se incubaron con conjugados de DiI-LDL en ausencia de LDL no marcada. Para visualizar todas las células presentes en la preparación, se tiñeron los núcleos con el compuesto fluorescente DAPI (paneles **A**, **D** y **G**). La superposición de las dos fluorescencias se muestra en los paneles **C**, **F** e **I**.

comprobar la especificidad de la unión, se realizaron controles añadiendo al medio de cultivo un exceso (0.5 mg/mL) de LDL no marcada, para que compita con la marcada, aboliendo así la unión de ésta. En los controles incubados con un exceso de LDL no marcada, se inhibía esta unión e internalización (datos no mostrados), por lo que podemos concluir que la asociación de los conjugados DiI-LDL con las células se debe a una interacción específica de las LDL con el receptor de LDL. Si la incubación se realiza con células CHO *ldlA7* transfectadas con el “plásmido vacío” (CHO-mock, Figura 29 panel G), no se observa unión e internalización de los complejos DiI-LDL (Figura 29 panel H), ya que el receptor de estas células no es funcional.

Este control permite concluir que la interacción con LDL observada en las células CHO-hLDLR y CHO-C358Y está mediada por el receptor transfectado y no por el receptor endógeno de las células CHO *ldlA7*.

3.2 Estudio de la forma precursora del receptor de LDL

3.2.1 Cinética de conversión de la forma precursora del receptor de LDL en receptor maduro

Para estudiar más a fondo la cinética de conversión de la forma precursora del receptor de LDL mutado a la forma madura, se realizaron ensayos de pulso y caza con ^{35}S -Met y posterior inmunoprecipitación en las líneas celulares establecidas CHO-hLDLR y CHO-C358Y. Para ello, se sembraron placas con células a una misma densidad inicial. Tras tres días de cultivo se sometieron a un pulso breve de 15 min, en medio de cultivo carente de L-Met suplementado con ^{35}S -Met. Después de retirar el medio radiactivo y sustituirlo por medio normal, se recogieron placas a los tiempos de caza que se muestran en la Figura 30, entre 0 y 45 min para las células que expresan el receptor silvestre y hasta 150 min en el caso de aquellas que expresan el receptor mutante (puesto que, como hemos visto, el procesado aquí se encuentra retrasado). La monocapa de células se lisó y se realizó la inmunoprecipitación del receptor de LDL empleando el anticuerpo policlonal mencionado anteriormente (ver página 77), conjugado a proteína A-Sepharose. Los inmunoprecipitados se sometieron a electroforesis en condiciones reductoras y los geles se procesaron para fluorografía.

En la Figura 30A se puede observar cómo en las células CHO-hLDLR se detecta a tiempo 0 (carril 1) una banda con la movilidad electroforética que corresponde a la forma precursora del receptor de LDL humano. A los 45 min de caza (Figura 30A, carril 4), la banda que corresponde al precursor ha disminuido, convirtiéndose en receptor maduro, aunque en el gel todavía se aprecie una tenue banda que corresponde al precursor endógeno de las células CHO. Se realizaron experimentos análogos, en paralelo a los anteriores, con las células CHO-C358Y (Figura 30B) en los que se pudo comprobar que tras 45 min de caza (carril 3) existe una acumulación de precursor y la forma madura es menos intensa, lo que confirma (ver Figura 28)

que se produce un retraso en el transporte y procesamiento post-traduccional del precursor a proteína madura.

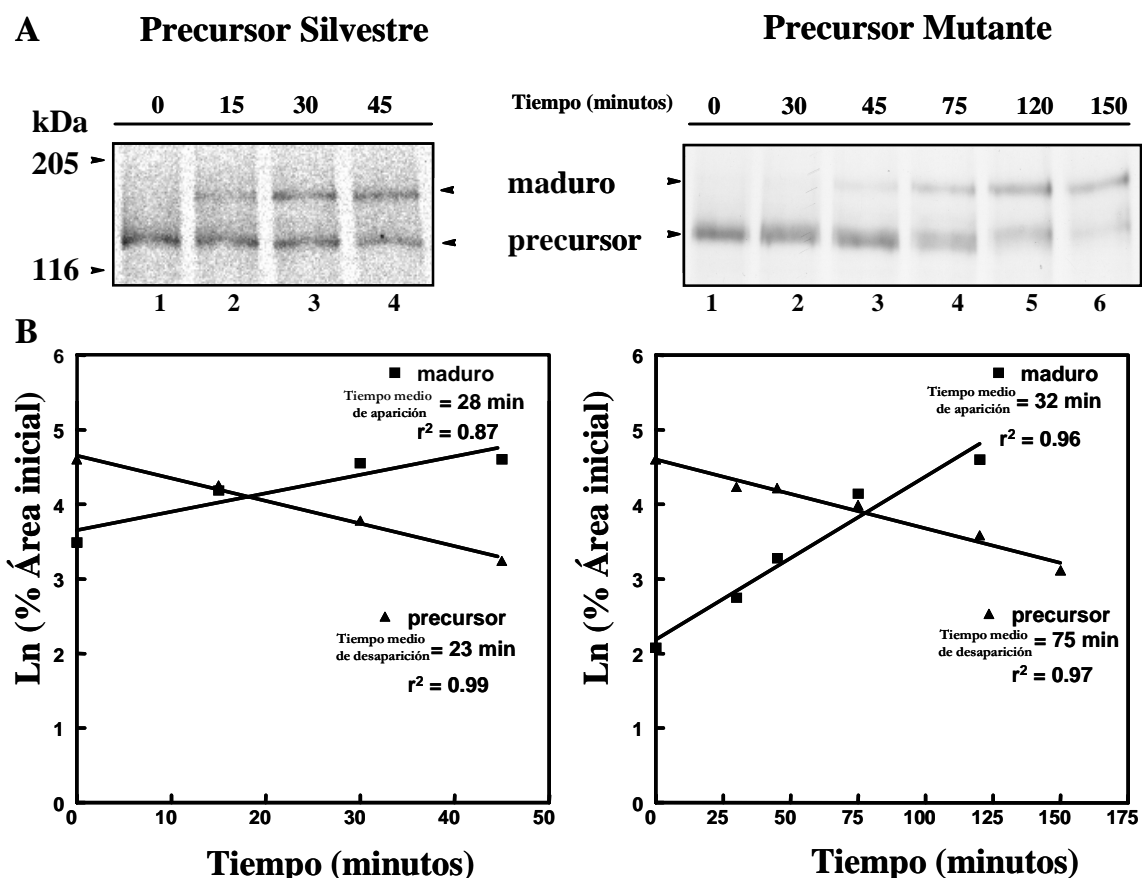


Figura 30. Cálculo del tiempo medio de desaparición de las formas precursora del receptor de LDL silvestre y mutante y del tiempo medio de aparición de la forma madura.

(A) Ensayo de pulso (15 min) y caza (a los tiempos indicados) en las líneas celulares CHO-hLDLR y CHO-C358Y con posterior inmunoprecipitación del receptor de LDL silvestre y mutante. En (B) se muestran los valores de tiempos medios de aparición y desaparición, así como el coeficiente de regresión lineal (r^2).

La cuantificación por densitometría de estas bandas permite valorar la radiactividad asociada a cada una de ellas y, por consiguiente, calcular el tiempo medio de desaparición de la forma precursora del receptor de LDL silvestre y mutado expresado en estas células. En la Figura 30B se muestra la relación entre la duración de la caza y el logaritmo neperiano del valor del área densitométrica, expresada como porcentaje del área inicial a tiempo 0. Los valores experimentales se ajustan a una recta, cuya pendiente permite calcular el tiempo medio de

desaparición de la proteína precursora. Para estos valores y para cada uno de los tiempos se restó la contribución de la forma precursora endógena de las células CHO *ldlA7* (datos no mostrados).

Considerando los resultados obtenidos, hemos estimado que el tiempo medio de desaparición de la forma precursora del receptor de LDL silvestre es de 23 min, valor que concuerda con el descrito en la bibliografía (Brown y Goldstein, 1986), mientras que la de la forma mutada es de 75 min, es decir, aproximadamente tres veces más lenta que la normal. Si nos fijamos en el tiempo medio de aparición de la forma madura silvestre y mutada, observamos que en ambos casos, el tiempo medio de aparición de las formas maduras es del mismo orden: 28 y 32 min, respectivamente. Sin embargo, de los datos experimentales podemos calcular que, en cada tiempo, la cantidad de precursor mutante que desaparece por conversión a la forma madura representa el 70% del total de precursor que desaparece. Por tanto, no todo el precursor sintetizado puede procesarse a receptor maduro y, al menos, un 30 % desaparece con una vida media estimada de 6 h. Esto explicaría el menor tiempo medio de desaparición del precursor mutante (75 min), que es el resultado de una doble cinética: una normal de conversión a maduro y otra más lenta de degradación (ver Discusión).

En cambio, en el receptor silvestre la desaparición por conversión a maduro es muy próxima al 100% y los tiempos medios de desaparición de precursor y de aparición de la forma madura son del mismo orden. Estos resultados coinciden con los encontrados en la bibliografía en fibroblastos humanos, que cifran el tiempo medio de conversión del precursor humano silvestre en 15-30 min (Brown y Goldstein, 1986).

A la vista de estos resultados, podemos decir que la mutación estudiada es una mutación de la Clase 2B que retrasa el transporte y procesamiento del precursor del receptor de LDL.

3.2.2 Estudio de la vía degradativa de la forma precursora mutada

Para determinar la vía degradativa responsable de la desaparición de la forma precursora, que no es procesada, del receptor de LDL que porta la mutación, ensayamos el efecto de distintos inhibidores de la proteólisis sobre la degradación del receptor en células CHO-C358Y. Basándonos en los resultados obtenidos en el estudio del segundo objetivo de esta Tesis Doctoral (Fuertes *et al.*, 2003b) se empleó por un lado, una combinación de leupeptina (0.1 mM) y NH_4Cl (20 mM) para inhibir las vías lisosomales y, por otro, se utilizó lactacistina (10 μM) como inhibidor específico del proteasoma. El experimento consistió en la realización de un ensayo de pulso y caza con ^{35}S -Met, similar al realizado para valorar el tiempo medio de desaparición de la forma precursora del receptor pero en presencia, durante la totalidad de la caza, de los inhibidores de proteasas mencionados. Tras un pulso de 15 min, se añadían los inhibidores al medio de caza y, transcurrida 1 h tras el pulso para obtener la máxima eficacia de los mismos, se analizó la degradación durante 3 h. A los tiempos indicados, se obtuvieron los extractos celulares y se procesaron para llevar a cabo la inmunoprecipitación con el anticuerpo policlonal del receptor de LDL. El inmunoprecipitado obtenido se sometió a PAGE-SDS y los geles se procesaron para fluorografía.

En la Figura 31 se puede observar cómo la banda correspondiente a la forma precursora se acumula en las células incubadas con inhibidores de lisosomas (panel A, carriles 2, 4) y especialmente cuando se combinan (carril 6). La cuantificación densitométrica de las bandas (Figura 31B) muestra que se produce una inhibición de la degradación del receptor de LDL en presencia de NH_4Cl , de leupeptina o de ambos inhibidores juntos, del 55, 43 y 95% respectivamente. En cambio, las células incubadas en presencia de lactacistina (panel B, carril 8) apenas ven afectada esa degradación. El escaso efecto de los inhibidores del proteasoma sobre la degradación de la forma precursora mutada, se confirma en experimentos en los que las células fueron incubadas conjuntamente con los inhibidores de la vía lisosomal y proteasomal (carriles 3, 5 y 7), ya que la presencia del inhibidor del proteasoma no incrementa la inhibición obtenida con los inhibidores lisosomales (53, 46 y 98% de inhibición con la combinación de inhibidores lisosomales y del proteasoma frente a 55, 43 y 95% con los inhibidores de lisosomas sólo, respectivamente).

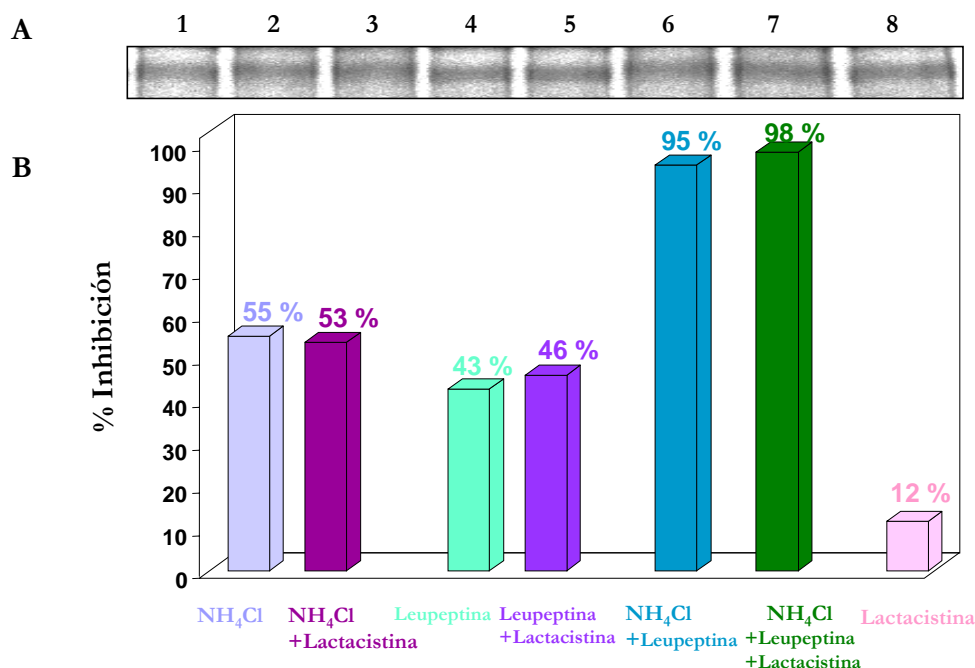


Figura 31. Efecto de diversos inhibidores de la proteólisis sobre la degradación de la forma precursora del receptor de LDL que porta la mutación C358Y.

(A) Experimento de pulso y caza con ³⁵S-Met en células CHO-C358Y. Tras un pulso de 15 min se realizó una caza a tiempo 0 (transcurrida 1 h desde que finaliza el pulso) y tras 3 h en ausencia (carril 1) o en presencia de los inhibidores indicados (carriles 2 al 8). Tras la caza, se recogieron las células y se inmunoprecipitó el receptor de LDL. Después de la electroforesis en condiciones reductoras, el gel se sometió a fluorografía. **(B)** Los histogramas muestran el porcentaje de inhibición respecto a la degradación producida en ausencia de inhibidores durante las 3 h de caza. Los valores mostrados son la media de al menos tres experimentos con diferencias menores del 10%.

Por tanto, estos resultados muestran que el precursor de LDL que no puede ser procesado a la forma madura debido a la presencia de la mutación (y que representa al menos el 30% del precursor sintetizado), se acumula y es degradado mayoritariamente por una vía lisosomal (ver Discusión). Además, puede observarse que esta forma precursora que no se convierte en forma madura tiene una movilidad electroforética ligera pero apreciablemente menor que la que corresponde a la proteína precursora de 120 kDa (ver carriles 5 y 6 de la Figura 30A y carriles 6 y 7 de la Figura 31A).

3.3 Estudio de la estabilidad del receptor maduro de LDL con la mutación C358Y

Para determinar cómo afecta la mutación C358Y a la estabilidad del receptor de LDL, estudiamos la vida media de su forma madura, mediante ensayos de pulso y caza con ^{35}S -Met en las líneas celulares establecidas por transfección estable. Para ello, se sembraron placas con células CHO-hLDLR y CHO-C358Y a una misma densidad inicial. Tras tres días de cultivo se sometieron a un pulso de 2 h, en medio de cultivo carente de L-Met, con ^{35}S -Met. Después de retirar el medio radiactivo y sustituirlo por medio completo (ver Material y Métodos), se recogieron placas a los tiempos de caza de 0, 2, 4, 8 y 24 h. La monocapa de células se lisó y se realizó la inmunoprecipitación del receptor de LDL empleando el anticuerpo policlonal descrito anteriormente conjugado a proteína A-Sepharose. Los inmunoprecipitados se sometieron a electroforesis en condiciones reductoras y los geles se procesaron para fluorografía. En las células CHO-hLDLR (Figura 32A, panel izquierdo) se puede observar como a las 4 h de caza (carril 2), la banda que corresponde a la de la proteína madura ha perdido algo de intensidad respecto a la banda que aparece a las 2 h (carril 1), y esta pérdida se ve incrementada gradualmente en los tiempos de caza posteriores (carriles 3 y 4).

La cuantificación por densitometría de la intensidad de estas bandas permite valorar la radiactividad asociada a cada una de ellas y, por consiguiente, calcular la vida media del receptor silvestre de LDL expresado en células CHO-hLDLR. En la Figura 32B, panel izquierdo, se muestra la representación del logaritmo neperiano de la intensidad de cada banda, expresada como porcentaje del área al tiempo inicial (2 h), en función del tiempo correspondiente. Decidimos emplear ese tiempo como inicial con el fin de evitar el incremento en la forma madura marcada que ocurre durante las primeras horas debido al procesamiento de la forma precursora, tanto en el receptor silvestre como en el mutante (ver Figura 30A). Los valores experimentales se ajustan a una recta (con un coeficiente de regresión lineal de -0.9993), el valor de cuya pendiente permite calcular la vida media ($t_{1/2}$) de la proteína mediante la ecuación $t_{1/2} = -\ln 2 / \text{pendiente}$. En base a los resultados obtenidos, hemos estimado que la vida media del receptor silvestre de LDL es de 10.9 ± 0.2 horas (media \pm S.D. de dos experimentos). Este valor concuerda con el descrito en fibroblastos humanos por Casciola *et al.* (1989) y Grant *et al.* (1990), de 11 y 10.7 h, respectivamente.

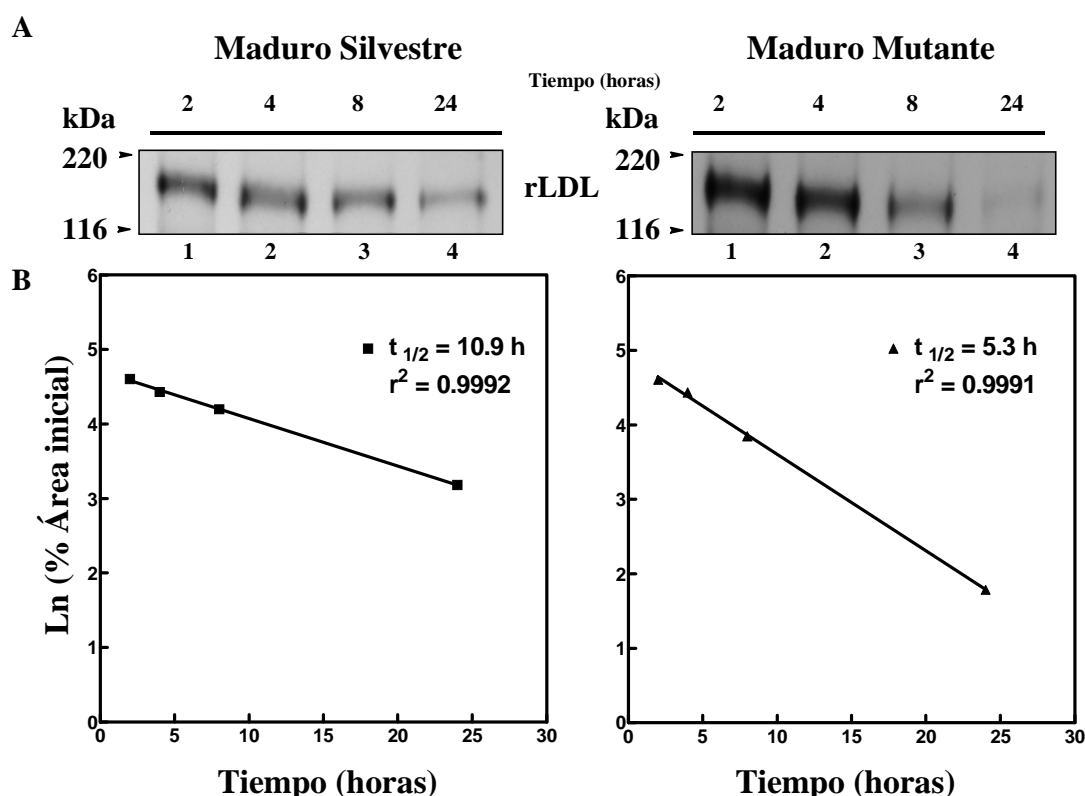


Figura 32. Cálculo de la vida media de la forma madura silvestre y mutante del receptor de LDL. **(A)** Ensayos de pulso (2 h) y caza (a los tiempos indicados) con ^{35}S -Met en las líneas celulares CHO-hLDLR y CHO-C358Y y posterior inmunoprecipitación del receptor de LDL (LDLR) silvestre y mutado. En **(B)** se muestra el valor de la vida media ($t_{1/2}$) calculado a partir de la pendiente de la recta resultante, así como su coeficiente de regresión lineal (r^2).

Se realizaron experimentos análogos, en paralelo a los anteriores, con las células CHO-C358Y (Figura 32A, panel derecho) en los que se aprecia cómo la intensidad de la banda correspondiente a la forma madura del receptor disminuye, en los tiempos de caza más prolongados, mucho más rápidamente que en el caso del receptor silvestre (comparar los carriles 1-4 en la Figura 32A del receptor silvestre y mutado), llegando a ser prácticamente inapreciable tras 24 h de caza (Figura 32A, carril 4 en el panel derecho). Tras el análisis densitométrico de las bandas se deduce (Figura 32B, panel derecho) que la vida media de la proteína mutada (C358Y) es de $5.3 \pm 0.6 \text{ h}$ (media \pm S.D. de dos experimentos).

A la vista de estos resultados, podemos concluir que la mutación estudiada en el receptor de LDL determina que este receptor, una vez alcanzada la forma madura, se degrade casi 2 veces más rápido que la proteína silvestre.

3.4 Estudio comparativo de los mecanismos de degradación del receptor maduro silvestre de LDL y de la forma mutante C358Y

Por último, se analizaron las vías por las que ocurre la degradación del receptor maduro silvestre y de su forma mutante. Se ha postulado que la degradación de receptor de LDL silvestre ocurre por una vía no lisosomal en base a resultados negativos obtenidos con inhibidores lisosomales (Casciola *et al.*, 1989; Grant *et al.*; 1990; Hare, 1990; Shite *et al.*, 1990). Para dilucidar qué vías degradativas pudiera seguir el receptor maduro, se ensayaron los efectos de distintos inhibidores de proteasas (ver apartado 3.2.2) sobre su degradación en células CHO-hLDLR. El experimento consistió en la realización de un ensayo de pulso y caza con ³⁵S-Met, igual al realizado para valorar la vida media del receptor, pero en presencia, durante la totalidad de la caza, de los inhibidores de proteasas. Tras un pulso de 2 h, el tiempo 0 se tomó 1 h después de finalizar el pulso, para permitir que la mayor parte de la forma precursora se convirtiera en forma madura (ver Figura 30A, panel izquierdo) y así poder seguir exclusivamente el efecto de los inhibidores sobre la cinética de degradación del receptor maduro. Se realizó un único tiempo de caza de 6 h de duración (aproximadamente la mitad de su vida media) en ausencia o presencia de los diferentes inhibidores.

Los resultados obtenidos con inhibidores se muestran en la Figura 33. Se observa una aceleración en la degradación del receptor maduro de LDL en presencia de NH₄Cl (Figura 33 carril 2). En presencia de leupeptina (Figura 33 carril 4) la inhibición es de un 31%, lo que indica que parte del receptor llega a lisosomas, pero esta vía por sí sola no justifica la degradación del receptor, ya que alrededor de un 70% escapa a la inhibición de proteasas lisosomales. Este porcentaje de receptor que no es sensible a inhibidores lisosomales sí lo es a lactacistina, ya que la inhibición encontrada es del 74%. Cuando se emplean conjuntamente la leupeptina y la lactacistina, la inhibición de la degradación es de un 90%, es decir, los efectos de los inhibidores son al menos en parte aditivos. Por otro lado, nuestros resultados muestran que, cuando se utilizan conjuntamente NH₄Cl y leupeptina, la aceleración que produce el primero de los inhibidores se compensa con el efecto del segundo, y no se aprecia acumulación del receptor (ver Discusión).

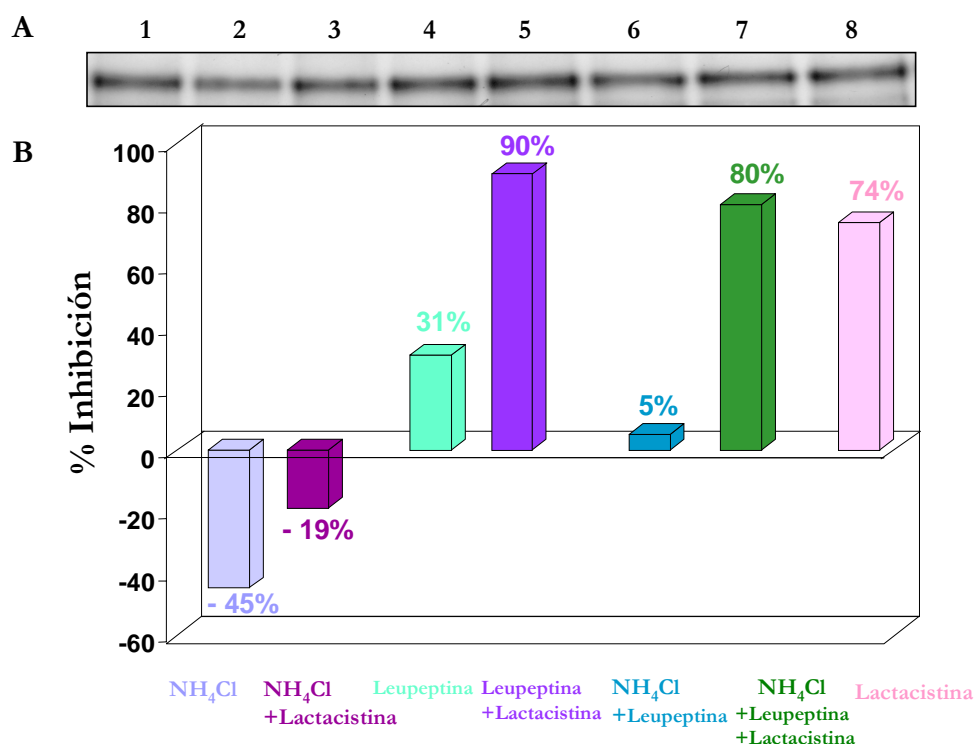


Figura 33. Efecto de diversos inhibidores de la proteólisis sobre la degradación de la forma madura del receptor de LDL silvestre.

(A) Experimento de pulso y caza con ³⁵S-Met en células CHO-hLDLR (ver texto). Tras un pulso de 2 h se realizó una caza a tiempo 0 (transcurrida 1 h desde que finaliza el pulso) y a 6 h en ausencia (carril 1) o presencia de los inhibidores indicados (carriles 2 al 8). Tras la caza se recogieron las células y se inmunoprecipitó el receptor de LDL. Después de la electroforesis en condiciones reductoras, el gel se sometió a fluorografía. (B) Los histogramas muestran el porcentaje de inhibición respecto a la degradación producida entre el tiempo 0 y 6 h de caza en ausencia de inhibidores. Los valores representados son la media de tres experimentos con diferencias menores del 10%.

Se realizaron experimentos análogos, en paralelo con los anteriores, con las células CHO-C358Y, con la diferencia de que el tiempo 0 se tomó 3 h después de finalizar el pulso, para permitir que la mayor parte de la forma precursora se convirtiera en forma madura (ver Figura 30B, panel derecho) y así poder seguir exclusivamente el efecto de los inhibidores sobre la cinética de degradación del receptor maduro durante un único tiempo de caza de 6 h (aproximadamente una vida media) en ausencia o presencia de los diferentes inhibidores. En la Figura 34 se puede observar cómo la banda correspondiente a la forma madura se acumula en las células incubadas con los inhibidores de lisosomas (panel A, carriles 2, 4 y 6). La cuantificación densitométrica de las bandas (Figura 34B) muestra que se produce una inhibición de la degradación del receptor de LDL en presencia de NH₄Cl, leupeptina, o de

forma aditiva con ambos inhibidores juntos, del 60, 24 y 87%, respectivamente. En cambio, las células incubadas en presencia de lactacistina (panel B, carril 8) apenas ven afectada su degradación. El que los proteasomas no intervengan en la degradación de la forma madura mutada, se confirma también cuando las células son incubadas conjuntamente con los inhibidores de la vía lisosomal y proteasomal (carriles 3, 5 y 7), ya que la presencia del inhibidor del proteasoma no incrementa el efecto obtenido con los inhibidores lisosomales (60, 24 y 87% de inhibición empleando los inhibidores de lisosomas, frente a 55, 27 y 90% de inhibición con la combinación de inhibidores de lisosomas y del proteasoma).

Por tanto, el estudio con inhibidores de las vías degradativas intracelulares, revela que la vía lisosomal es la responsable de este rápido recambio del receptor maduro mutado, por lo que podemos concluir que el receptor humano mutante se degrada mayoritariamente en lisosomas (ver Discusión).

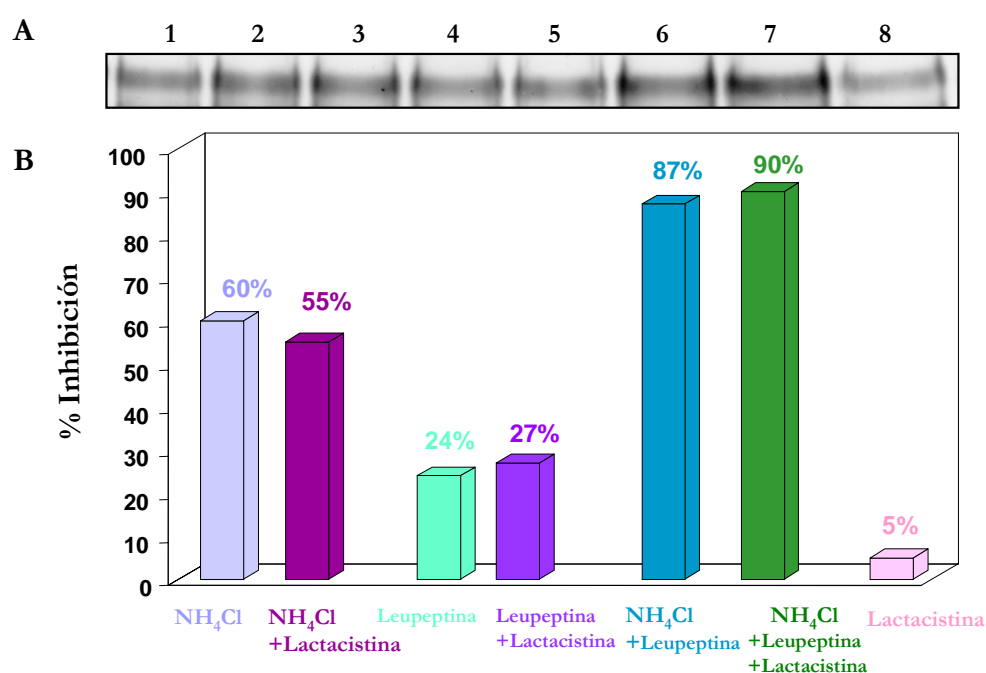


Figura 34. Efecto de diversos inhibidores de la proteólisis sobre la degradación de la forma madura del receptor de LDL que porta la mutación C358Y.

(A) Experimento de pulso y caza con ³⁵S-Met en células CHO-C358Y (ver texto). Tras un pulso de 2 h se realizó una caza a tiempo 0 (transcurridas 3 h desde que finaliza el pulso) y a 6 h en ausencia (carril 1) o presencia de los inhibidores indicados (carriles 2 al 8). Tras la caza, se recogieron las células y se inmunoprecipitó el receptor de LDL. Después de la electroforesis en condiciones reductoras, el gel se sometió a fluorografía. (B) Los histogramas muestran el porcentaje de inhibición respecto a la degradación producida entre el tiempo 0 y 6 h de caza en ausencia de inhibidores. Los valores representados son la media de tres experimentos con diferencias menores del 10%.

DISCUSIÓN

1. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LOS PROTEASOMAS Y DE SUS COMPLEJOS REGULADORES EN CÉLULAS DE MAMÍFERO

Cuando comenzamos estos estudios se desconocían aún algunas de las múltiples funciones que hoy se sabe que desempeñaban los proteasomas aunque, lógicamente, se pensaba que debían estar relacionadas con sus actividades proteolíticas. Asimismo, los datos acerca de su localización, y que podían ser útiles para hipotetizar aquellas, resultaban por aquel entonces aún confusos y discutidos. Nuestro laboratorio ha obtenido suficientes evidencias de que los proteasomas, en hígado de rata y en células de mamífero cultivadas, se localizan tanto en el núcleo como en el citoplasma (Knecht *et al.*, 1991; Rivett *et al.*, 1992; Rivett y Knecht, 1993 y Resultados de esta Tesis Doctoral). Aunque la localización nuclear ha estado sometida a controversia, ya desde hace algunos años, la localización aceptada por la gran mayoría de investigadores para los proteasomas es tanto el núcleo como el citoplasma (Rivett, 1998; Knecht y Rivett, 2000; Gordon, 2002; Wójcik y DeMartino, 2003).

En el núcleo, los proteasomas se encuentran dispersos por todo el nucleoplasma pero, principalmente localizados en la periferia de la heterocromatina y del nucleolo donde se acumulan alrededor del mismo, y más en concreto, en la periferia de la heterocromatina nucleolar y de las áreas fibrilares. Esta localización de los proteasomas es consistente con una participación de los mismos no solamente en la degradación de proteínas citosólicas sino también en la degradación de proteínas nucleares. Puesto que los lisosomas son orgánulos exclusivamente citoplásmicos y son incapaces de autofagocitar fragmentos nucleares, la existencia de un sistema degradativo en el interior del núcleo permitiría la rápida degradación de proteínas reguladoras de vida media corta. Entre estos sustratos se encuentran, por ejemplo, factores de transcripción como NF- κ B que, entre otras, regula las actividades de genes implicados en la respuesta inmune e inflamatoria (Palombella *et al.*, 1994), el supresor tumoral p53 (Chowdary *et al.*, 1994) y productos de proto-oncogenes como *c-fos* (Bossis *et al.*, 2003).

En el citoplasma celular, los proteasomas no se encuentran en el interior de ningún orgánulo, sino dispersos por el citosol y, en ocasiones, asociados a la superficie externa de la membrana del retículo endoplásmico, (Knecht *et al.*, 1991; Rivett *et al.*, 1992; Palmer *et al.*, 1996

y ver Figuras 1 y 2 de Resultados). Como es sabido, en la presentación de antígenos por parte de los MHC clase I, los péptidos antigénicos que han sido generados en el citosol, han de ser transportados al interior del retículo endoplásmico para unirse a las moléculas de este complejo. Este transporte se lleva a cabo a través de un transportador de la familia ABC, un heterodímero formado por dos subunidades, TAP1 y TAP2, mediante un proceso que requiere ATP y cuyos genes se han localizado en el *locus* del MHC clase II. Por tanto, la asociación de los proteasomas al retículo endoplásmico, junto a la identificación de dos genes que codifican para dos subunidades del proteasoma (LMP2 y LMP7) también en el *locus* del MHC clase II y situados en la proximidad de los genes *tap1* y *tap2* que codifican para las dos subunidades del transportador de péptidos antigénicos generados en el citoplasma celular, sugirió la posibilidad de que el proteasoma pudiera ser la proteasa responsable de generar estos péptidos en el citosol, que luego se transportarían al retículo endoplásmico (Goldberg y Rock, 1992; Goldberg *et al.*, 2003; Niedermann, 2002). De hecho la síntesis de estas subunidades, al igual que la de TAP1 y TAP2, era inducida por el γ -interferón.

Un estudio más detallado de la localización de los proteasomas en hígado de rata revela que estos se asocian a fracciones microsomales enriquecidas en retículo endoplásmico liso y en la fracción *cis* del complejo de Golgi (ver Figura 2 de Resultados). Esta localización (Palmer *et al.*, 1996; Wójcik y DeMartino, 2003) coincide exactamente con la de los transportadores de péptidos antigénicos TAP1 y TAP2 que también se han localizado mediante técnicas de inmuno-oro y microscopía electrónica, en la membrana del retículo endoplásmico liso y en la región *cis* del complejo de Golgi. Estas observaciones apoyan de nuevo la participación de los proteasomas en la presentación de antígenos por parte de los MHC clase I.

Por otro lado, lavados sucesivos de los microsomas hacen desaparecer progresivamente los proteasomas asociados a los mismos, aunque, si tenemos en cuenta los volúmenes de lavado, esa desaparición es menor que la que cabría esperar si se tratase de una mera contaminación citosólica. La interpretación más probable de estos resultados es que los proteasomas se encuentran asociados débilmente a los microsomas (Palmer *et al.*, 1996). Puesto que, durante el proceso de homogeneización, los microsomas se forman siempre exponiendo la cara citoplásmica del retículo endoplásmico hacia fuera (DePierre *et al.*, 1988), y teniendo en cuenta las observaciones anteriores, podría concluirse que una parte de los proteasomas en el

citoplasma se encuentran asociados débilmente a la cara citosólica de la membrana del retículo endoplásmico liso y de la región *cis* del complejo de Golgi (Palmer *et al.*, 1996). Puesto que nuestros resultados sitúan al proteasoma fuera del lumen del retículo endoplásmico, esta observación constituyó una evidencia de que la degradación las proteínas del retículo endoplásmico por esta vía tenía que ocurrir tras ser transportadas al citosol o, alternativamente, su degradación debía iniciarse por el lado citosólico de la proteína transmembrana (Palmer *et al.*, 1996).

Como vimos en la Introducción, en los proteasomas de mamífero se han identificado, aparte de las 14 subunidades homólogas a las de levadura, 3 subunidades más que tienen en común que su expresión es inducida por el tratamiento de las células con γ -interferón. Estas subunidades son LMP2, LMP7 y MECL-1 y, aparentemente, cuando se inducen por γ -interferón se incorporan juntas a los proteasomas (Griffin *et al.*, 1998) sustituyendo a sus tres subunidades homólogas (Y, X y Z, respectivamente) y dando lugar a otra subpoblación de proteasomas con diferente composición en subunidades. Puesto que estas subpoblaciones podrían ocupar diferentes localizaciones dentro de la célula nos propusimos estudiar a continuación si los proteasomas en las diferentes localizaciones subcelulares presentaban una composición distinta en sus subunidades. Para estos estudios elegimos como material de trabajo hígado de rata, por permitir la obtención de fracciones subcelulares de mayor pureza. Los análisis por inmunotransferencia de cada una de las fracciones de hígado de rata con anticuerpos que reconocen distintas subunidades α y β de los proteasomas pusieron de manifiesto que, efectivamente, existían algunas diferencias en cuanto a la composición en subunidades de los proteasomas asociados a las distintas fracciones subcelulares (ver Figura 4 de Resultados). Por un lado, no parecen existir cambios significativos en la distribución de las subunidades α si las comparamos con la distribución del proteasoma en su conjunto, analizada esta última con un anticuerpo policlonal anti-proteasoma (comparar la Figura 1A con la Figura 4 y la Figura 1B con la Tabla 1 de Resultados). Sin embargo, cuando analizamos la distribución de dos de las subunidades β del proteasoma, LMP2 y Z, éstas varían en su distribución relativa en las distintas fracciones. La subunidad LMP2 se encuentra ligeramente enriquecida en la población de proteasomas asociada a los microsomas (ver Tabla 1 de Resultados). Una segunda subpoblación de proteasomas que parece presentar una localización preferente en los núcleos es la que incluye a la subunidad Z. El enriquecimiento de la subunidad Z en el núcleo, con

respecto a otras fracciones, es bastante notable (Tabla 1 de Resultados) y esto indica que debe desempeñar alguna función específica en esta localización, aunque la naturaleza de la misma es todavía desconocida. Por otro lado, los niveles de la subunidad LMP2 en el interior del núcleo comparados con los de la subunidad Z son más bajos mientras que la subunidad Z está prácticamente ausente en la población de proteasomas asociada a microsomas. Esto sugiere que la mayoría de proteasomas pertenecientes a cada una de estas dos subpoblaciones descritas, no parecen contener LMP2 y Z en el mismo complejo, es decir, que el proteasoma que ha intercambiado Y por LMP2 no contiene Z, posiblemente porque ha sido intercambiada también por MECL-1. Puesto que en el momento de realizar estos experimentos no disponíamos aún de anticuerpos para esta subunidad, esta posibilidad está pendiente de estudiar.

Los resultados, anteriores, constituyeron la primera evidencia descrita de que distintas subpoblaciones de proteasomas que difieren en su composición en subunidades muestran una localización preferente en la célula (Palmer *et al.*, 1996). El hecho de que estas subpoblaciones varíen en su composición en las subunidades β y que sean estas subunidades las que han sido definidas como catalíticas supone que estas subpoblaciones, con localización distinta dentro de la célula, podrían presentar también diferente función.

Los resultados presentados en la Figura 5 de Resultados muestran que las subunidades del proteasoma 20S y de los complejos que lo regulan, 19S y 11S, no se encuentran en cantidades apreciables como subunidades libres. Los niveles de los diferentes complejos se determinaron por inmunotransferencia utilizando anticuerpos que reconocen específicamente las distintas subunidades. Ya que no hay complejo 19S libre, los anticuerpos anti-p45 utilizados en este trabajo determinan los niveles y distribución de los proteasomas 26S. El nivel de proteasoma 20S es dos o tres veces superior al del 26S, y esto se observó tanto en hígado de rata como en líneas celulares cultivadas. Es posible que el proteasoma 20S pueda funcionar sólo, aunque parte de él se encuentre formando proteasomas PA28-20S. El hecho de que no detectemos este complejo en nuestros fraccionamientos celulares, se debe probablemente a las condiciones elegidas para la filtración en gel, ya que otros autores han observado estos complejos en condiciones diferentes (Ahn *et al.*, 1996; Hendil *et al.*, 1998).

Los resultados con anticuerpos que reconocen el proteasoma 26S (ver Figura 4 y Tablas 1 y 2 de Resultados) confirman que este se encuentra localizado en el núcleo, en el citoplasma y asociado con microsomas, lo que puede ser importante para la degradación de proteínas en el retículo, gran parte de la cual es dependiente de ubiquitina (Sommer y Wolf, 1997).

La presencia de LMP2 y LMP7 en proteasomas 26S, pero en menor proporción que en los proteasomas 20S (ver Figura 6 de Resultados), es consistente con una función del proteasoma 26S en la generación de antígenos, probablemente dependiente de ubiquitina, para ser presentados por el MHC clase I (Rock y Goldberg, 1999) y nuestros resultados sugieren que los péptidos antigénicos se deben producir en la proximidad del retículo endoplásmico para transportarse eficientemente por el transportador TAP. Resultados previos (Mason *et al.*, 1998), basados en inmunoprecipitación de células marcadas con L-[³⁵S]metionina, han sugerido algunas diferencias en la estructura del complejo regulador 19S. Las variaciones que encontramos en la distribución de las subunidades individuales del complejo 19S en distintas localizaciones (ver Figura 4 y Tabla 1 de Resultados) proporcionan una evidencia adicional en apoyo de esta sugerencia.

La proporción de proteasomas 26S frente a los proteasomas 20S es mayor en el núcleo que en citoplasma, y esto se observó tanto por subfraccionamiento celular de hígado de rata como por microscopia de fluorescencia de células L-132. El hecho de que la localización nuclear de los proteasomas por inmunofluorescencia en células en cultivo sea más notable que la observada en los análisis por inmunotransferencia en hígado (ver Figuras 4 y 7 de Resultados), se puede explicar por el volumen relativamente bajo del núcleo en el hepatocito (Rivett *et al.*, 1992). Aunque la localización nuclear de los proteasomas ha sido discutida durante mucho tiempo, Peters *et al.* (1994), también encontraron que el complejo regulador 19S del proteasoma 26S estaba enriquecido en núcleos de oocitos de *Xenopus*, y hoy esta doble localización núcleo-citosólica de los proteasomas es aceptada por prácticamente todos los investigadores.

La localización de los proteasomas en levaduras (Enenkel *et al.*, 1998; Wilkinson *et al.*, 1998 y Russell *et al.*, 1999) también se ha establecido, con subunidades marcadas con la

proteína verde fluorescente, y parecen estar predominantemente asociados con la envuelta nuclear/ER (Enekel *et al.*, 1998; Wilkinson *et al.*, 1998). Sin embargo, utilizando pequeños "tags", Russell *et al.* (1999) encontraron que los proteasomas de levadura están distribuidos en el núcleo y con un nivel muy bajo en el citoplasma. Por otro lado, estos mismos autores encontraron que el nivel de las subunidades del complejo regulador 19S que están presentes en levadura es el mismo que una subunidad del proteasoma central 20S. Estos resultados son consistentes con nuestras observaciones mostrando que los proteasomas 26S son relativamente más abundantes en el núcleo de células de mamífero y que algunos proteasomas 26S están asociados con el retículo endoplásmico. Los resultados obtenidos en células de mamífero muestran que los proteasomas 20S son más abundantes que el complejo regulador 19S de los proteasomas 26S. Por ello, parte de esos proteasomas 20S podrían unirse a complejos PA28, los cuales, igual que las subunidades del 20S inducibles por γ -interferón, están ausentes en levaduras. La abundancia de proteasomas en el núcleo de levadura debe reflejar su papel crítico en la regulación de la progresión del ciclo celular en unas células que se están dividiendo rápidamente. Por el contrario, las células de mamífero de tejidos no se dividen, generalmente, rápidamente y, por ello, los proteasomas deben desempeñar funciones especializadas adicionales, tales como el procesamiento de antígenos.

Nuestros resultados (ver Tabla 1 y Figuras 4 y 8 de Resultados) acerca de que las subunidades PA28 α y PA28 β están mayoritariamente en el citoplasma de hígado de rata y de células L-132 (Brooks *et al.*, 2000) están en contraposición con los resultados de Wójcik *et al.* (1998) obtenidos mediante inmunofluorescencia en células precursoras neuronales NT2 y en células HeLa S3, que mostraban PA28 α y PA28 β en el citoplasma y en el nucleolo. Soza *et al.* (1997), por su parte, publicaron que ambas subunidades del complejo PA28 estaban distribuidas por igual entre el citoplasma y el núcleo de células B8 (fibroblastos de ratón). Nuestros resultados también muestran que no hay una gran diferencia en la distribución subcelular de PA28 tras un tratamiento con γ -interferón. Esta distribución de PA28 en el citoplasma, tras el tratamiento con el γ -interferón, debe reflejar su papel propuesto en la presentación de antígenos que se cree que ocurre principalmente en el citoplasma y la función de PA28 γ en la relación con proteasomas del núcleo aún no ha sido establecida.

2. CONTRIBUCIÓN DE LOS PROTEASOMAS Y DE OTRAS VÍAS PROTEOLÍTICAS A LA DEGRADACIÓN INTRACELULAR DE PROTEÍNAS, EN FIBROBLASTOS HUMANOS EN DIFERENTES CONDICIONES DE CRECIMIENTO

2.1 Análisis de diferentes inhibidores de las vías proteolíticas proteasomales y lisosomales

En el análisis de inhibidores específicos de las vías proteolíticas encontramos que la combinación de NH_4Cl y leupeptina es la que inhibe las vías lisosomales de forma más efectiva entre todas las combinaciones probadas (ver Figura 10 de Resultados). La mayor parte de la inhibición se debe al NH_4Cl que se ha demostrado que entra a los lisosomas donde se protona y se acumula incrementando así el pH intralisosomal (Seglen, 1983). La leupeptina, sin embargo, inhibe las cisteín-proteasas como las catepsinas B, H y L (Seglen, 1983) y aumenta la inhibición lisosomal producida por el NH_4Cl . Aunque la leupeptina también actúa en condiciones *in vitro* sobre algunas proteasas no lisosomales (por ejemplo calpaínas), se ha demostrado que la leupeptina, de forma similar a otro inhibidor de catepsinas lisosomales, el *trans*-epoxisuccinil-L-leucilamido-(4-guanidinio)butano, no es permeable a través de las membranas y, por tanto, debe entrar en la célula por endocitosis (Wilcox y Mason, 1992). Los pHs óptimos de las actividades de las cisteín-proteasas lisosomales oscilan entre 3.5 y 6 y, por ello, son más cercanos al pH neutro que los de las aspártico-proteasas, que son más ácidos (3-5). Por tanto, lo más probable es que el efecto adicional de la leupeptina sobre la inhibición producida por el NH_4Cl , se deba a la inhibición de la actividad residual que les queda a las cisteín-proteasas lisosomales al pH lisosomal neutro producido por el NH_4Cl .

Cuando ensayamos diferentes inhibidores de proteasomas observamos que dos de ellos, el MG132 y el ALLN, empleados frecuentemente desde que se describieron en 1994 (Rock *et al.*, 1994), eran muy eficientes inhibiendo la degradación intracelular de proteínas. Sin embargo, estos inhibidores no son específicos de los proteasomas ya que también inhiben, en un porcentaje elevado, la degradación lisosomal (ver Figura 10 de Resultados). Por el contrario, la lactacistina (Fenteany *et al.*, 1995), que se convierte espontáneamente en el medio extracelular

en β -clasto lactona permeable a las células (Dick *et al.*, 1996; Craiu *et al.*, 1997), es menos efectiva inhibiendo la degradación de proteínas que los inhibidores anteriores. Esto es debido a que su acción es más específica sobre los proteasomas, ya que la inhibición que produce es aditiva con la producida por el NH_4Cl más la leupeptina. Esta especificidad también la encontramos con otros inhibidores, como la β -clasto lactona (Craiu *et al.*, 1997), lo que es lógico puesto que la lactacistina actúa convirtiéndose en este producto (Dick *et al.*, 1996; Craiu *et al.*, 1997), o la epoxomicina (Fenteany *et al.*, 1995). También analizamos el efecto de otro inhibidor, el MG262, una droga que pertenece al grupo de los inhibidores de proteasoma que contienen boronato y en el que se incluye también el PS-341 (Adams *et al.*, 1998). El PS-341 es un inhibidor de los proteasomas que se está utilizando ya en Estados Unidos en tratamientos clínicos del mieloma múltiple (Garber, 2002). El MG262 resultó bastante efectivo a concentraciones bajas y su efecto inhibitorio, como ocurría con la lactacistina, es aditivo al obtenido con NH_4Cl más leupeptina. No pudimos ensayar aquí los efectos del PS-341 por no encontrarse todavía disponible comercialmente, aunque su comportamiento debe ser similar al del MG262.

La lactacistina también inhibe a la catepsina A (Ostrowska *et al.*, 2000), pero la función de esta carboxipeptidasa de la membrana lisosomal parece que se limita sólo a la hidrólisis de algunos péptidos reguladores (Itoh *et al.*, 1995). Se ha propuesto recientemente que la catepsina A regula la autofagia mediada por chaperonas degradando a la proteína lamp2a, que es el receptor lisosomal de esta vía (Cuervo *et al.*, 2003). Sin embargo la lactacistina, debido a la aditividad de su inhibición sobre la degradación intracelular de proteínas con la de los inhibidores lisosomales, no parece modificar la degradación lisosomal de proteínas de vida media larga, al menos en las condiciones que hemos investigado esa aditividad (4 h en ausencia de suero). También se sabe que la lactacistina, empleada a altas concentraciones, inhibe a la proteasa gigante o tripeptidil peptidasa II (Geier *et al.*, 1999). Sin embargo, nosotros encontramos que a concentraciones superiores a 10 μM no se incrementa el efecto inhibitorio de la lactacistina sobre la degradación intracelular de proteínas, ni tampoco cuando utilizamos la epoxomicina, que se supone que es más específica inhibiendo el proteasoma que la lactacistina (Meng *et al.*, 1999). Por tanto, parece que la proteasa gigante tiene un papel limitado en la degradación de proteínas de vida media larga, al menos en las células utilizadas aquí para los ensayos de aditividad de los efectos de los diferentes inhibidores.

Para inhibir la macroautofagia hemos utilizado la 3-MA (Seglen y Gordon, 1982; Seglen *et al.*, 1986), un agente que actúa sobre la familia de enzimas 3'fosfatidil inositol quinasas (PI3K) (Blommaert *et al.*, 1997; Petiot *et al.*, 2000). La clase III de PI3K está implicada probablemente en el control de la formación de las vacuolas autofágicas (Petiot *et al.*, 2000), mientras que se requiere a la clase I de PI3K, que se encuentran asociadas a la membrana plasmática, para transducir una señal negativa en la biogénesis de las vacuolas autofágicas (Kihara *et al.*, 2001). Por tanto, una posible explicación para la activación de la proteólisis producida por la 3-MA en presencia de suero y aminoácidos es que, en estas condiciones, la clase I se active y la clase III se inactive o actúe con muy baja eficiencia, mientras que en ausencia de suero o de aminoácidos ocurra al contrario. Sin embargo, existen explicaciones alternativas para los resultados anteriores y todas estas posibilidades están por investigar. De las diferencias obtenidas en las inhibiciones con NH₄Cl más leupeptina y 3-MA (ver Figura 10 de Resultados) parece concluirse que vías lisosomales diferentes a la macroautofagia están actuando en la degradación intracelular de proteínas. De hecho, cuando se trabaja con células embrionarias de ratón deficientes en Apg5 que tienen completamente bloqueada la macroautofagia, se ha observado que intervienen vías lisosomales diferentes de la macroautofagia y que son responsables del 30-40% de la degradación de proteínas inducida por el ayuno (Mizushima *et al.*, 2001).

2.2 Contribución de las principales vías proteolíticas a la degradación de proteínas de vida media corta

Una vez establecidos los inhibidores más idóneos, hemos analizado la contribución de las diferentes vías proteolíticas a la degradación de proteínas de vida media corta en fibroblastos humanos en diferentes condiciones de crecimiento. Con este objetivo utilizamos diversos procedimientos desarrollados con anterioridad (Knecht *et al.*, 1980; Wheatley *et al.*, 1982; Corella *et al.*, 1998) para poder estudiar en fibroblastos humanos y de forma separada las fracciones de proteínas de vida media larga y corta que componen las proteínas marcadas durante un pulso breve. Estas dos fracciones de proteínas se degradan juntas, pero sus cinéticas de degradación están claramente separadas por una discontinuidad (ver Figura 12 y Tabla 3 de Resultados) que las identifica sin ambigüedad. Las proteínas de vida media corta se degradan independientemente del tiempo de pulso con una vida media de 1 h

aproximadamente y, aunque sólo representan menos del 1% de la proteína que existe en estado estacionario, contribuyen en una gran proporción (alrededor del 30% o más) a la degradación que ocurre en fibroblastos humanos. Esto está en concordancia con cálculos anteriores (Wheatley *et al.*, 1982).

La naturaleza de esas proteínas de vida media corta ha sido materia de especulación. Puesto que no existe discontinuidad en la vida media de las diferentes proteínas celulares (Goldberg y St. John, 1976), y las proteínas de vida media corta están claramente separadas del resto de proteínas celulares, las VMC probablemente representan proteínas recién sintetizadas que se degradan rápidamente como sugirieron previamente Wheatley *et al.* (1980). Nosotros hemos confirmado los resultados de Wheatley *et al.* (1980) ya que no observamos diferencias en el patrón electroforético de proteínas de vida media corta y larga (Aniento, Roche y Knecht, observaciones no publicadas). Además, encontramos en otro tipo celular por filtración en gel que el tamaño molecular de las VMC es menor que el de las de VML, y también que las VMC son más susceptibles a las proteasas *in vitro* (Aniento, Roche y Knecht, observaciones no publicadas). Más recientemente se ha descrito también, que una gran proporción de proteínas recién sintetizadas (más del 30% según Kloetzel, 2001) no llegan a su localización subcelular porque son reconocidas y degradadas rápidamente por el sistema proteasoma ubiquitina-dependiente. Esas proteínas, la mayoría de las cuales probablemente no sean funcionales debido a errores en la traducción y/o en el plegamiento post-traducciona (Turner y Varshavsky, 2000), son productos ribosomales defectuosos y se las denomina DRIPs (Schubert *et al.*, 2000). Además, se ha propuesto que esta extensa degradación citosólica representa una fuente importante de péptidos antigénicos para la presentación por el complejo principal de histocompatibilidad clase I (Reits *et al.*, 2000).

Hemos analizado, en diferentes condiciones de crecimiento la degradación de proteínas marcadas durante un tiempo breve y existe un aumento de la degradación de estas proteínas en confluencia y en ausencia de suero. Sin embargo, parece que esas diferencias afectan principalmente, sino exclusivamente, a las proteínas de vida media larga. Una vez caracterizado el grupo de proteínas de vida media corta, utilizamos inhibidores específicos de las vías proteolíticas para estudiar la degradación de estas proteínas en diferentes condiciones de crecimiento. En nuestros estudios, diferentes combinaciones de inhibidores lisosomales y

proteasomales fueron incapaces de suprimir completamente la degradación de proteínas marcadas durante un pulso breve en cualquier condición. Aunque esta degradación la atribuimos a otras vías no lisosomales y no proteasomales hay que hacer notar que parte de esta degradación no inhibida refleja la liberación al medio de cultivo de proteínas de las células insolubles en ácido tricloroacético. Esta liberación representa, durante las 4 h de caza, el 5-7.5% de la radiactividad inicial asociada a las proteínas marcadas durante un tiempo breve de pulso. La mayoría de esas proteínas debe corresponder a proteínas de secreción ya que la viabilidad, tras el periodo de caza de 4 h, era mayor del 98%. De hecho, esta liberación se reduce a la décima parte tras 8 h de caza. Sin embargo, es posible que algunos de los inhibidores utilizados sean incapaces de inhibir completamente todas las actividades de sus respectivas vías afectadas (Tournu *et al.*, 2001), o bien que esos inhibidores afecten a las vías de degradación de proteínas no lisosomales y no proteasomales. Por tanto, el cálculo de la contribución exacta o precisa de esas vías a la degradación de proteínas marcadas durante un pulso breve requeriría la utilización de inhibidores específicos de proteasas citosólicas (por ejemplo calpaínas) y de orgánulos (Bota y Davies, 2001; Huang y Wang, 2001). En cualquier caso, teniendo en cuenta los resultados obtenidos, la contribución de estas proteasas no proteasomales y no lisosomales en el recambio de estas proteínas corta es bastante bajo.

Analizando el efecto de los inhibidores de las vías proteolíticas sobre la degradación de proteínas marcadas durante un tiempo breve de pulso y sobre la fracción de proteínas de vida media larga, se puede investigar la contribución de las diferentes vías a la degradación de proteínas de vida media corta (ver Figura 16 de Resultados). De acuerdo con esto, en fibroblastos humanos los proteasomas degradan al menos el 60% de las proteínas de vida media corta y la macroautofagia no parece estar implicada, al menos en nuestras condiciones. En la mayoría de nuestros experimentos hemos utilizado L-[³H]leucina en el pulso y 2 mM L-Leu en la caza, y se sabe que la leucina es un inhibidor de la macroautofagia en hepatocitos en cultivo (Seglen *et al.*, 1980) y en hígado (Pösö *et al.*, 1982). Sin embargo, no encontramos diferencias en los efectos de la 3-MA cuando marcamos las células con L-[³H]valina y empleamos 10 mM de L-Val durante la caza. Puesto que todos los experimentos se realizaron en presencia de aminoácidos, es posible que la adición de 2 mM de L-Leu ya no produzca una inhibición adicional. Es posible también que la L-Leu sea menos efectiva inhibiendo la macroautofagia en fibroblastos humanos que en otros tipos celulares como los hepatocitos.

Las vías lisosomales diferentes a la macroautofagia están claramente implicadas en la degradación de proteínas de vida media corta en todas las condiciones de crecimiento. Nuestros resultados apoyan la importancia de la actividad lisosomal sobre todo en células confluentes y en ausencia de suero, ya que la inhibición del NH_4Cl más leupeptina es incluso más eficiente que la producida por los inhibidores proteasomales. Puesto que suele afirmarse que los proteasomas son los responsables de la degradación de proteínas de vida media corta parece sorprendente que los lisosomas puedan ser responsables de una importante proporción de la degradación de proteínas de vida media corta en células en crecimiento exponencial (ver Figura 17 de Resultados). Sin embargo, hay algunos ejemplos de proteínas de vida media corta que se degradan en lisosomas. Así, BRCA1, una proteína supresora de tumores, se degrada con una vida media de 2 h y esta degradación ocurre por lisosomas y no por proteasomas ni por calpaínas (Blagosklonny *et al.*, 1999). Además, es posible que la importancia relativa de los proteasomas y de los lisosomas en la degradación total de proteínas, incluyendo las de vida media corta, varíe en diferentes tipos celulares y en diferentes condiciones. De hecho, se ha demostrado que los lisosomas son responsables de más del 50% de la degradación de proteínas marcadas durante un tiempo de pulso breve (1 h) en hepatocitos en un estado de balance proteico negativo (Schwarze y Seglen, 1983).

En conclusión, los proteasomas y los lisosomas contribuyen en más de un 80% a la degradación de proteínas de vida media corta en fibroblastos humanos. Por tanto, si estas proteínas de vida media corta corresponden principalmente a DRIPs, esta degradación representa un control de calidad de proteínas que no consiguen obtener su estructura nativa. De acuerdo con eso, esta degradación prevendría sucesos tóxicos de agregación de proteínas (Wickner *et al.*, 1999; Ma y Hendershot, 2001). Dado que la patología de determinadas enfermedades como Alzheimer, Parkinson y otras puede estar asociada a fallos en estos procesos de degradación (Slavotinek y Biesecker, 2001), parece claro que no sólo los proteasomas (Bence *et al.*, 2001) sino también los lisosomas estarían implicados en estas patologías. Por otro lado, si como se ha postulado los productos de degradación de DRIPs representan un origen de péptidos antigénicos (Kloetzel, 2001; Reits *et al.*, 2000; Shubert *et al.*, 2000) y si los resultados obtenidos aquí con lisosomas también ocurren en células que expresan en su superficie el complejo principal de histocompatibilidad clase II, entonces estos antígenos

intracelulares también serán presentados por esta clase de complejos principales de histocompatibilidad y no sólo por los complejos principales de histocompatibilidad clase I.

2.3 Contribución de las principales vías proteolíticas a la degradación de proteínas de vida media larga

Las proteínas de vida media larga constituyen el conjunto de proteínas más abundantes en la célula. Los proteasomas constituyen una vía proteolítica importante en la degradación de proteínas en todas las condiciones de crecimiento (ver Figuras 19, 23 y 25 de Resultados). Sin embargo, aún en presencia de aminoácidos, son responsables de la mitad o menos de esta degradación y el resto de la misma ocurre por vías lisosomales y no lisosomales. Particularmente y de acuerdo con resultados obtenidos por otros autores en diferentes tipos celulares (Goldberg y St.John, 1976; Mayer y Doherty, 1986; Gordon y Seglen, 1989), existe un considerable aumento en la degradación macroautofágica de proteínas de vida media larga en ausencia de suero o en ausencia de aminoácidos. De hecho, nuestros resultados indican que el 80% aproximadamente del incremento que se produce en la degradación de proteínas en ausencia de suero se debe a macroautofagia. Sin embargo, los proteasomas son responsables de aproximadamente el 20% del aumento de la degradación de VML en células en crecimiento exponencial, lo que, al menos en ausencia de suero, se debe probablemente al aumento de proteínas conjugadas a ubiquitina (ver Figura 22 de Resultados). Se cree que el aumento en la degradación de proteínas en ausencia de suero o de aminoácidos no es selectiva y, puesto que los proteasomas están implicados en el recambio selectivo (Glickman y Ciechanover, 2002), es posible que sólo un grupo específico de proteínas esté multiubiquitilado, pero esto habría que investigarlo. Por el contrario, las vías lisosomales diferentes de la macroautofagia parece que no están activadas por ausencia de suero o de aminoácidos, mientras que su contribución, pero no la de la macroautofagia, aumenta en condiciones confluentes y ayuno prolongado. Esto sugiere un tipo diferente de regulación de la macroautofagia y de las otras vías lisosomales de degradación intracelular de proteínas. Las características morfológicas de los lisosomas en células en crecimiento, en presencia o ausencia de suero, son diferentes, lo que está de acuerdo con los resultados anteriores obtenidos con los inhibidores. Se ha propuesto la actuación de vías diferentes a la macroautofagia (Knecht *et al.*, 1998; Dice, 2000). Los procesos responsables de la degradación lisosomal en presencia de suero se desconocen, pero podrían incluir

microautofagia, que al menos en hepatocitos parece que está regulada por factores diferentes de los que controlan la macroautofagia (Mortimore *et al.*, 1988). Se ha postulado que en células confluentes en ayuno prolongado se activa la vía autofágica mediada por chaperonas (Dice, 2000). El porcentaje de degradación de proteínas en condiciones de presencia o ausencia de suero disminuye en ayuno prolongado y, probablemente, esta disminución se deba a la fuerte reducción en la macroautofagia. Por el contrario la contribución a la degradación de proteínas de las vías lisosomales diferentes de la macroautofagia aumenta, probablemente porque la maquinaria lisosomal necesita ser más específica seleccionando sustratos que no comprometan la viabilidad celular y la vía autofágica mediada por chaperonas, y quizás la microautofagia, reúnen mejor este requisito que la macroautofagia.

En células confluentes, la contribución relativa de los proteasomas a la degradación de proteínas disminuye, especialmente en ausencia de aminoácidos. Esta disminución también se observaba en proteínas de vida media corta (Fuertes *et al.*, 2003a), resultados de esta Tesis Doctoral. Aunque los niveles de proteínas ubiquitiniladas no cambian aparentemente en condiciones de confluencia, sorprendentemente encontramos que en esta condición, y al menos en presencia de aminoácidos, el complejo 19S es parcialmente reemplazado por el complejo regulador PA28 y que las subunidades β proteolíticamente activas son reemplazadas por nuevas subunidades β catalíticas intercambiables del inmunoproteasoma de una forma similar a lo que ocurre después de la estimulación con γ -interferón (Rivett *et al.*, 2001). Si esos cambios pueden explicar la disminución observada en la actividad del proteasoma en condiciones de confluencia está todavía por investigar.

En el caso de las proteínas de vida media larga, tampoco ninguna combinación de los inhibidores lisosomales y proteasomales es capaz de suprimir completamente la degradación como ocurre también con las VMC. Parece que las vías distintas de los lisosomas y de los proteasomas también actúan a un nivel relativamente más bajo en la degradación de las VML (15-20% de la degradación total). Estas vías están inactivadas en ausencia de suero en células en crecimiento exponencial y activadas en células confluentes en ausencia de aminoácidos. Sin embargo, y como se ha mencionado antes, es posible que algunos de los inhibidores utilizados sean incapaces de inhibir completamente todas las actividades de sus respectivas vías afectadas,

o bien que esos inhibidores afecten a las vías de degradación de proteínas no lisosomales y no proteasomales.

En conclusión, nuestros resultados demuestran que: i) unos inhibidores son más apropiados que otros para investigar la participación de diferentes vías proteolíticas en la degradación intracelular de proteínas; ii) en fibroblastos humanos, los proteasomas y los lisosomas son igualmente responsables en la degradación intracelular de proteínas (más del 80%); iii) las distintas vías proteolíticas que intervienen en la degradación de las VML están activadas o inhibidas de forma diferente según la condición de crecimiento. Por tanto, a la vista de estos resultados sería interesante investigar las señales específicas que controlan la actividad de las diferentes vías proteolíticas que degradan proteínas intracelulares.

3. ESTUDIO DE LA IMPLICACIÓN DEL PROTEASOMA Y DE OTRAS VÍAS PROTEOLÍTICAS EN LA DEGRADACIÓN DE UNA PROTEÍNA ESPECÍFICA DE MEMBRANA PLASMÁTICA: EL RECEPTOR DE LDL

Como se ha comentado anteriormente, una de las mutaciones más frecuentes en población española en el gen que codifica para el receptor de LDL, que causan Hipercolesterolemia Familiar (FH), es la mutación C358Y. Esta mutación se ha descrito también en población japonesa (Hirayama *et al.*, 1998) y otra sustitución del mismo residuo (C358R) también es la causa de Hipercolesterolemia Familiar (Bertolini *et al.*, 1999).

Puesto que el retículo es el lugar donde ocurre el plegamiento y la maduración de muchas proteínas, y también donde se detectan las proteínas mal plegadas o innecesarias que son degradadas por el proteasoma mediante vías dependientes e independientes de ubiquitina (Sommer y Wolf, 1997; Roberts, 1997) quisimos estudiar la posible implicación del proteasoma en la degradación del receptor de LDL, ya que podría utilizarse ésta como proteína modelo para estudiar la degradación por los proteasomas de proteínas en tránsito por el retículo endoplásmico. Además, el receptor de LDL es una importante proteína de membrana cuyo mecanismo de degradación es controvertido. El tercer objetivo de esta Tesis Doctoral se centró pues en el estudio del efecto de la mutación C358Y sobre las vías degradativas de la forma precursora y de la forma madura del receptor de LDL así como en el mecanismo de degradación del receptor silvestre.

Debido a la dificultad para disponer de fibroblastos humanos portadores de la mutación C358Y, como aproximación experimental obtuvimos líneas celulares que expresaban el receptor humano de LDL, silvestre o mutado, de forma constitutiva. Mediante la transfección de células CHO *ldlA7* que expresan un receptor de LDL endógeno no funcional (actividad menor del 1% de la del silvestre Kozarsky *et al.*, 1986), se obtiene un sistema celular modelo en el que estudiar la expresión de la forma silvestre o formas mutadas del receptor de LDL humano. Las líneas celulares seleccionadas expresan constitutivamente una cantidad de receptor similar a la observada en fibroblastos humanos, y este receptor puede experimentar todas las modificaciones postraduccionales requeridas para su correcta localización y función.

La funcionalidad del receptor humano expresado por estas células ha sido comprobada por nuestro grupo de diversas formas. Así, el receptor une e internaliza de forma específica LDL, tal y como se deduce de los resultados mostrados en la Figura 29. Además, mediante ME y empleando de LDL conjugada con oro coloidal hemos corroborado el dato anterior, y hemos comprobado la localización celular tanto del receptor como de las partículas de LDL unidas e internalizadas. Por último, mediante la cuantificación mediante técnicas espectroscópicas del oro asociado a las células incubadas en presencia de LDL conjugada con oro coloidal (Martín de Llano *et al.*, 1996; Martín de Llano *et al.*, 2000), nuestro grupo ha determinado que el receptor humano silvestre expresado por las células CHO presenta una afinidad por la unión de LDL similar a la que muestra el receptor de LDL expresado por fibroblastos humanos mantenidos en cultivo. En cuanto al receptor mutado C358Y, las células CHO C358Y unen e internalizan LDL (Figura 29 de Resultados), pero su afinidad por el ligando es menor que la del receptor silvestre, según estudios realizados empleando células transfectadas transitoriamente (Puig, 1996).

En las células transfectadas con el receptor mutante C358Y, se observaba un retraso en el transporte y procesamiento postraduccional del precursor a proteína madura (ver Figuras 27 y 28 de Resultados). Esto coincide con las observaciones de Puig (1996) sobre diferencias en la movilidad electroforética del receptor mutante en condiciones no reductoras, expresado por células transfectadas transitoriamente, que podrían deberse a un plegamiento anómalo de la proteína, a un procesamiento defectuoso o a ambas cosas.

3.1 Estudio de la forma precursora del receptor de LDL

Al estudiar la cinética de conversión de la forma precursora del receptor de LDL que porta la mutación a la forma madura, comprobamos que, en comparación con el procesamiento del receptor silvestre, existe una acumulación de la forma precursora y una disminución de la forma madura (ver Figura 30 de Resultados), lo que confirma que se produce un retraso en el transporte y procesamiento postraduccional del precursor a proteína madura.

El tiempo medio de desaparición de la forma precursora del receptor de LDL silvestre expresado en estas células es de 23 min, valor que concuerda con el descrito en la bibliografía

para el receptor expresado por fibroblastos humanos, y que es de 15-30 min (Brown y Goldstein, 1986). El tiempo medio de desaparición de la forma mutada, en cambio, es de 75 min, es decir, aproximadamente tres veces más lenta que la del receptor de LDL silvestre. Si comparamos el tiempo medio de aparición de la forma madura normal y mutada observamos que en ambos casos, es del mismo orden: 28 y 32 min, respectivamente. Sin embargo, en contraste con el precursor del receptor silvestre, la cantidad en cada tiempo, de precursor mutante que desaparece por conversión a la forma madura representa el 70% del total de precursor que desaparece. Por tanto, no todo el precursor sintetizado puede procesarse a receptor maduro y, al menos, un 30% desaparece con una vida media estimada de 6 h. Esto explicaría el menor tiempo de desaparición del precursor mutante (75 min), que es el resultado de una doble cinética: una normal de conversión a maduro y otra más lenta de degradación. Quizá esta mutación afecte al plegamiento del receptor haciendo que adopte dos conformaciones, una reconocida por las glicosidasas responsables del procesamiento postraducciona, que llegaría a membrana plasmática, y otra que quedaría retenida en el retículo endoplásmico, siendo posteriormente degradada. En cambio, en el receptor silvestre, la desaparición por conversión a maduro es cercana al 100% y los tiempos medios de desaparición de precursor y de aparición de maduro son del mismo orden. Considerando todo lo anterior, podemos concluir que la mutación estudiada es una mutación de Clase 2B (ver Figura 30 de Resultados) que retrasa el transporte y procesamiento del precursor del receptor de LDL.

Para determinar la vía degradativa responsable de la desaparición de la forma precursora, que no es procesada, del receptor de LDL C358Y, ensayamos el efecto de distintos inhibidores de la proteólisis sobre la degradación de este receptor expresado en células CHO-C358Y. Para la selección de los inhibidores nos basamos en los resultados obtenidos en el estudio del segundo objetivo de esta Tesis. Como se observa en la Figura 31 (ver Resultados), se produce una inhibición del 95% en la degradación del receptor de LDL en presencia de NH_4Cl y de leupeptina, mientras que los inhibidores del proteasoma producen un efecto muy escaso sobre la degradación de la forma precursora mutada. Por tanto, estos resultados muestran que el precursor de LDL, que no puede ser procesado a la forma madura debido a la presencia de la mutación (y que representa aproximadamente el 30% del precursor sintetizado), se acumula y es degradado mayoritariamente por una vía lisosomal. Esto nos indicaría que esta

forma mutada escapa de alguna manera a la maquinaria degradativa que actúa a nivel del retículo y que conduce al proteasoma (Hugues et al., 1997). Además, esta forma precursora que no se convierte a la forma madura tiene una movilidad electroforética algo menor que la que corresponde a la proteína precursora de 120 kDa (ver Figuras 30 y 31 de Resultados). Por tanto, es probable que esta forma precursora sea una forma intermedia y que ya no continua su procesamiento normal, siendo degradada por los lisosomas. La posibilidad de que una misma proteína pueda adoptar más de una conformación, y que esto determine un diferente procesamiento o una diferente actividad funcional, ha sido descrito por otros autores. Así, la forma madura del receptor de LDL mutante Asp206Glu, puede adoptar dos conformaciones distintas; aunque ambas alcanzan la membrana plasmática, una de las poblaciones del receptor es incapaz de unir LDL (Fourie *et al.*, 1992). Por tanto, una posible explicación de los resultados obtenidos es la aparición, durante el procesamiento del receptor C358Y, de una forma del receptor relativamente estable que no puede llegar a ser procesada totalmente hasta forma madura, y que es degradada por los lisosomas.

3.2 Estudio de la forma madura del receptor de LDL

La vida media estimada para el receptor silvestre maduro de LDL es de 10.9 ± 0.2 horas y este valor concuerda con el descrito en fibroblastos humanos por Casciola *et al.* (1989), y Grant *et al.* (1990), de 11 y 10.7 h, respectivamente. Sin embargo, la vida media de la proteína mutada (C358Y) es de 5.3 ± 0.6 h, por lo que la mutación C358Y afecta también a la estabilidad del receptor de LDL una vez alcanzada la forma madura, haciendo que se degrade casi 2 veces más rápido que la proteína silvestre. Por tanto, la mutación C358Y disminuye la actividad y la estabilidad del receptor.

La degradación del receptor de LDL C358Y maduro se ve inhibida en un 87% en presencia de los inhibidores de lisosomas. En cambio, en presencia de lactacistina apenas se ve afectada. Por tanto, los proteasomas no parecen intervenir en la degradación de la forma madura del receptor de LDL mutado (ver Figura 34 de Resultados), siendo la vía lisosomal la responsable del rápido recambio de este receptor maduro mutado. Teniendo en cuenta que esta mutación se encuentra en el segundo dominio de homología con el factor de crecimiento epidérmico, al que se le adjudica una función reguladora, la mutación C358Y podría estar

afectando a la capacidad del receptor de desligarse de la LDL cuando disminuye el pH en el endosoma (Davis *et al.*, 1987), ya que en condiciones normales se separa de la LDL cuando el pH del endosoma es menor de 6 (Rudenko *et al.*, 2002). De esta manera, el receptor de LDL mutado acompañaría a las LDL hasta los lisosomas y se degradaría con ellas. Esto explicaría la vida media tan corta que presenta la forma madura mutante con respecto al receptor de LDL silvestre e indicaría que la mutación C358Y, además de ser de Clase 2B, es también de Clase 5.

Se ha postulado que la degradación de receptor de LDL silvestre ocurre por una vía no lisosomal en base a resultados negativos obtenidos empleando inhibidores lisosomales (Casciola *et al.*, 1989; Grant *et al.*, 1990; Hare, 1990; Shite *et al.*, 1990). Los resultados obtenidos con inhibidores muestran una aceleración en la degradación del receptor maduro de LDL en presencia de NH_4Cl , resultado que otros autores han encontrado también en fibroblastos humanos en presencia de ligando (Grant *et al.*, 1990); en este punto hay que señalar que nuestros ensayos están realizados en crecimiento exponencial con suero y, por tanto, en presencia de LDL). En presencia de leupeptina, la inhibición es de un 31 %, lo que indica que parte del receptor llega a lisosomas, pero esta vía por sí sola no justifica la degradación del receptor, ya que un 70 % escapa a la inhibición de proteasas lisosomales. Este porcentaje de receptor que no es sensible a inhibidores lisosomales, sí lo es a lactacistina, ya que la inhibición encontrada es del 74 %. Esto concuerda con los resultados de otros autores en líneas celulares derivadas de hepatocitos, donde, en presencia de lactacistina y en condiciones de estado estacionario (Miura *et al.*, 1996), observan un incremento en los niveles de receptor, aunque, debido al procedimiento experimental empleado, no pueden determinar qué porcentaje del receptor silvestre se degrada por esta vía. Cuando se emplean conjuntamente la leupeptina y la lactacistina, la inhibición de la degradación es de un 90 %. Es decir, los efectos de los inhibidores son razonablemente aditivos. Por otro lado, nuestros resultados muestran que, cuando se emplean juntos el NH_4Cl y la leupeptina, la aceleración que produce el primero de los inhibidores se compensa con el efecto del segundo y no se aprecia acumulación del receptor. Ésto explicaría que otros autores no hayan visto ningún efecto sobre la degradación del receptor con inhibidores lisosomales (Casciola *et al.*, 1989).

Por tanto, puede concluirse de estos resultados que el receptor silvestre se degrada principalmente por la vía del proteasoma, aunque una proporción del mismo es degradada por

lisosomas. Diversos trabajos se han centrado en el estudio de la degradación de receptores presentes en la membrana plasmática y que experimentan reciclado. Melman *et al.* (2002), empleando MG132 y lactacistina, han concluido que 19 de los residuos presentes en la cola citoplasmática de la proteína relacionada con el receptor de LDL (LRP) contienen señales implicadas en el reciclado del receptor como, probablemente, en su degradación mediante el proteasoma. Además, mediante el empleo de proteínas truncadas, concluyen que el fenómeno de la endocitosis y el de la degradación mediante el proteasoma suceden de forma independiente. Comparando la secuencia de la cola citoplasmática del receptor de LDL con el segmento citoplásmico de 19 residuos de la LRP, hemos observado que ambos presentan la secuencia NPVY; ésta es una secuencia de internalización, que recientemente se ha mostrado que está implicada en la interacción del receptor de LDL con ARH (proteína cuya alteración causa Hipercolesterolemia Autosómica Recesiva), un tipo de proteína adaptadora que presumiblemente acopla al receptor de LDL con la maquinaria de endocitosis (Cohen *et al.*, 2003). En lo que respecta a su degradación por el proteasoma, la comparación no nos permite concluir que existan otras secuencias homólogas entre ambas que comprendan más de 2 residuos consecutivos.

Nuestros resultados suponen, por tanto, una cooperación de las dos principales vías degradativas en la degradación de una proteína específica. Además, una mutación puntual (C358Y) puede determinar que la vía de degradación del receptor cambie ya que en el caso del receptor mutante (C358Y) la vía degradativa pasa a ser mayoritariamente lisosomal. Es decir, los dos sistemas proteolíticos mayoritarios cooperan en la degradación de una misma proteína y su importancia relativa puede variar por mutaciones puntuales en la secuencia de la misma.

CONCLUSIONES

OBJETIVO 1

1. En hígado de rata y en células cultivadas de mamífero los proteasomas se localizan sobre todo en el citosol, pero también en el núcleo y asociados a la cara externa de la membrana del retículo endoplásmico.
2. Aunque los diferentes proteasomas se encuentran en todas esas localizaciones, la proporción de proteasomas 26S, inmunoproteasomas y proteasomas PA28 asociada al retículo endoplásmico es mayor que la de los proteasomas 20S. Los inmunoproteasomas y los proteasomas PA28 se encuentran en cantidades pequeñas en el núcleo.
3. Las subunidades del proteasoma 20S y de sus complejos reguladores no se encuentran libres en las células en cantidades apreciables.

OBJETIVO 2

4. Los inhibidores MG132 y ALLN, que han sido utilizados ampliamente como inhibidores específicos de los proteasomas, son también inhibidores muy eficaces de las vías proteolíticas lisosomales.
5. Las principales vías proteolíticas en la degradación intracelular de proteínas de vida media corta y larga son los proteasomas y los lisosomas, que son responsables de un 80% o más de toda la degradación.

6. Las distintas vías proteolíticas se activan o inhiben de manera diferente en las diferentes condiciones de crecimiento. Así por ejemplo, la macroautofagia se activa en ausencia de suero y/o de aminoácidos y su importancia disminuye en el ayuno prolongado, mientras que otras vías lisosomales diferentes a la macroautofagia se activan en células confluentes y su importancia aumenta en el ayuno prolongado. En cuanto a los proteasomas, son más activos en ausencia de suero probablemente debido a un incremento en la cantidad de proteínas ubiquitiladas y son menos activos en confluencia debido a la sustitución del complejo regulador 19S y de las subunidades intercambiables del proteasoma 20S por el complejo regulador PA28 y las subunidades del inmunoproteasoma, respectivamente.

OBJETIVO 3

7. La mutación C358Y del receptor humano de LDL retrasa su maduración provocando que parte de la forma precursora sea degradada por lisosomas.
8. La forma madura del receptor humano de LDL se degrada mayoritariamente por proteasomas, pero también por lisosomas.
9. La mutación C358Y disminuye la estabilidad del receptor humano maduro de forma que su degradación transcurre a través de una vía casi exclusivamente lisosomal.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL

1.1 Inhibidores de la proteólisis

Lactacistina, β -clasto lactona, epoxomicina y Z-Leu-Leu-Leu-B(OH)₂ (MG262) se obtuvieron de Affiniti Research Products Limited (Mamhead, Exeter, UK).

3-metiladenina (3-MA), pepstatina A, wortmanina, concanamina A, cloroquina, bafilomicina A1, N-acetil-Leu-Leu-Met-aldehído (ALLM), N-acetil-Leu-Leu-Norleu-aldehído (ALLN) y fluoruro de fenilmetanosulfonilo (PMSF) procedían de Sigma Chemical Co. (Madrid, España).

Leupeptina se obtuvo de Peptide Institute Inc. (Osaka, Japón).

Z-Leu-Leu-Leu aldehído (MG132) se obtuvo de Affiniti Research Products Limited y de Peptide Institute Inc.

1.2 Isótopos radioactivos

L-[4,5-³H]leucina y L-[3,4(n)-³H]valina procedían de Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH (Freiburg, Alemania). Tran³⁵S-Label se obtuvo de ICN Pharmaceuticals (Irvine, Ca, EE.UU). Este reactivo contiene un 70% de L-[³⁵S]metionina, por lo que para simplificar lo denominamos ³⁵S-Met.

1.3 Otros materiales

El líquido de centelleo, OptiPhase "HiSafe" 2 era de Perkin Elmer (Buckinghamshire, Reino Unido). El resto de reactivos utilizados fueron de Merck (Darmstadt, Alemania), de Panreac Química S.A. (Barcelona, España), de Riedel-de-Häen (Seelze, Alemania) y de Sigma Chemical Co., y fueron siempre de la mejor calidad analítica disponible.

2. CULTIVOS CELULARES

L-132 es una línea celular derivada de pulmón embrionario humano (ATCC: CCL 5). Esta línea se cultivó en medio mínimo esencial de Eagle con sales de Earle (MEM, Invitrogen Life Technologies, Barcelona, España), conteniendo 10% de suero fetal bovino inactivado (calentando 30 min a 56°C) y 100 unidades de penicilina/mL y 100 μ g de estreptomycin/mL (Invitrogen Life Technologies).

Los cultivos primarios de fibroblastos humanos de individuos normales (GM03349B y GM03348D) se obtuvieron del depósito de células Coriell (Instituto Coriell de Investigación Médica, Camden, NJ, EE.UU), cultivándose en MEM suplementado con 20% de suero fetal bovino sin inactivar, 1x de aminoácidos esenciales, de no esenciales y de vitaminas, 100 unidades de penicilina/mL y 100 μ g de estreptomycin/mL (Invitrogen Life Technologies).

CHO *ldlA7* es una línea celular mutada procedente de ovario de hámster chino que no expresa un receptor funcional de LDL y que fue proporcionada amablemente por el Dr. M. Krieger (Departamento de Biología, Instituto de Tecnología de Massachusetts, Boston, MA, EE.UU). Se cultiva en monocapa, usando como medio de cultivo la mezcla de nutrientes F-12 de Ham (Ham's F-12, Invitrogen Life Technologies) suplementada igual que las células L-132.

Todas las líneas celulares se cultivan a 37°C en una atmósfera húmeda de 5% CO₂ y 95% de aire. La viabilidad de las células se estimaba mediante la prueba de exclusión del azul de Trypan (Flow Laboratories, McLean, Virginia, EE.UU) (Warburton y James, 1993). La densidad de las suspensiones celulares se estimó mediante el conteo de las células con un hemocitómetro (Warburton y James, 1993).

3. PURIFICACIÓN DE PROTEASOMAS

Los proteasomas 20S y 26S se purificaron a partir de hígado de rata como se describe en Rivett *et al.* (1994) y Reidlinger *et al.* (1997). En el ensayo de actividad se utilizó como sustrato el péptido sintético fluorescente, succinil-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-metilcoumarina (Peptide Institute Inc.), que se ha utilizado para medir la actividad similar a la quimotripsina del proteasoma. Para separar los proteasomas 20S y 26S por filtración de exclusión molecular, los hígados se lavaron y se homogeneizaron mediante 3 golpes de 30 s a máxima velocidad, en un homogeneizador de teflón-vidrio 853202 (B. Braun, Melsungen, Alemania) en 4 volúmenes de tampón Tris/HCl 20 mM pH 7.5 que contenía 20% (v/v) de glicerol, 1 mM de 2-mercaptoetanol, 0.1 mM de EDTA y 5 mM de ATP. El homogenado se centrifugó durante 1 h a 95,000g y el sobrenadante se separó por filtración de exclusión molecular mediante una columna Superose 6 de FPLC (Amersham Pharmacia) equilibrada con tampón Tris/HCl 20 mM, pH 7.5 con NaCl 100 mM y 10% (v/v) de glicerol.

4. ANTICUERPOS

4.1 Anticuerpos anti-proteasoma

En la Tabla 1 se muestra una relación de los diferentes anticuerpos primarios utilizados que reconocen diversas subunidades del proteasoma 20S o de sus complejos reguladores. Con algunos anticuerpos policlonales se llevó a cabo un paso adicional de purificación, obteniendo así anticuerpos, que designaremos como “purificados por afinidad”. En estos casos, el anticuerpo se incubaba, durante 12 h y a temperatura ambiente, con una membrana de nitrocelulosa a la que se había transferido electroforéticamente el antígeno. Tras lavados repetidos de la membrana con PBS, los anticuerpos unidos a ésta se disociaban de su unión al antígeno mediante una incubación de la membrana con tampón glicina, 100 mM, pH 2.5, durante 10 min a 25°C. La solución era inmediatamente neutralizada con 1 M Tris base para evitar la inactivación de los anticuerpos por el pH ácido. Estos anticuerpos policlonales purificados por afinidad fueron utilizados para la detección de proteasomas transferidos a membranas de nitrocelulosa.

La especificidad de los anticuerpos policlonales #617 y #544 (anti-proteasoma 20S) se muestra en la Figura 1. En geles de poliacrilamida-SDS los proteasomas aparecen compuestos por varias subunidades distintas, con masas moleculares que varían entre 22 y 34 kDa. Los anticuerpos #617 y #544 (anti-proteasoma 20S), purificados por afinidad, reaccionan con muchas de las subunidades de los proteasomas purificados de hígado de rata (comparar en la Figura 1 los carriles 3 y 4). Asimismo, tanto los anticuerpos #617 (Figura 1, carriles 5 y 6) como los #544 (resultados no mostrados) reaccionan específicamente con varios polipéptidos (con masas moleculares entre 22 y 34 kDa), de entre todas las proteínas presentes en extractos de hígado de rata y de células L-132 humanas.

Tabla 1. Anticuerpos primarios utilizados en esta Tesis Doctoral y que reconocen diversas subunidades del proteasoma 20S o de sus complejos reguladores

Nombre	Carácter/ Especie ¹	Subunidad Reconocida	Complejo	Procedencia ²
#617	*Po/Rb	Varias	20S	A. J. Rivett
#544	Po/Rb	Varias	20S	A. J. Rivett
MCP#20	Mo/M	C2 (α)	20S	K. Hendil
MCP#72	Mo/M	C8 (α)	20S	K. Hendil
MCP#257	Mo/M	C9 (α)	20S	K. Hendil
MCP#165	Mo/M	Z (β)	20S	K. Hendil
Anti- β 1	Mo/M	Y (β)	20S	Affiniti
Anti- β 5	Po/Rb	X (β)	20S	Affiniti
LMP2-13	Mo/M	LMP2	Inmuno-20S	K. Hendil
LMP7-1	Mo/M	LMP7	Inmuno-20S	K. Hendil
Anti- β 2i	Po/Rb	MECL-1	Inmuno-20S	Affiniti
P45-110	Mo/M	P45	19S	K. Hendil
TBP1-19	Mo/M	TBP1	19S	K. Hendil
P91A	*Po/Rb	S3	19S	A. Amar-Costesec
S12	*Po/Rb	S12	19S	A. J. Rivett
Anti-PA28 (α y β)	*Po/Rb	PA28 (α y β)	11S	M. Rechsteiner
Anti-PA28 α	*Po/Rb	PA28 α	11S	M. Rechsteiner
Anti-PA28 β	Po/Rb	PA28 β	11S	M. Rechsteiner
Anti-PA28 γ	Po/Rb	PA28 γ	11S	K. Tanaka

¹ Mo: monoclonal; Po: policlonal; M: Ratón; Rb: Conejo.

² A. J. Rivett (Universidad de Bristol, Bristol, Reino Unido); K. Hendil (Instituto August Krogh, Universidad de Copenhague, Dinamarca); Affiniti Research Products Limited (Mamhead, Exeter, Reino Unido); Dr A. Amar-Costesec (Universidad Católica de Lovaina, Bruselas, Bélgica); K.Tanaka (Instituto Metropolitano de Tokio de Ciencia Médica, Tokio, Japón) y M. Rechsteiner (Universidad de Utah, Salt Lake, EE.UU).

* Anticuerpos purificados por afinidad.

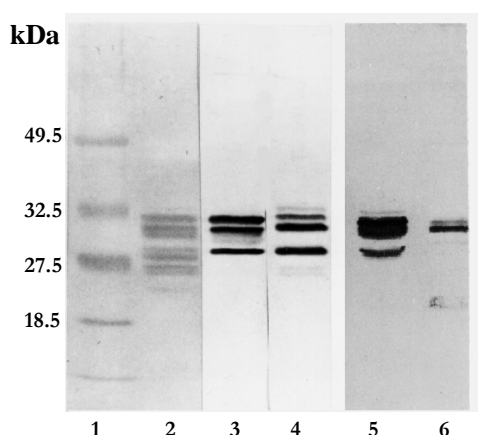


Figura 1. Especificidad de los anticuerpos anti-proteasoma #617 y #544.

Carriles 1 y 2: marcadores de peso molecular (1) y proteasomas purificados de hígado de rata (5 µg) (2) teñidos con rojo Ponceau S; carriles 3 y 4: inmunotransferencia de proteasomas purificados de hígado de rata (2 µg) analizada con los anticuerpos #617 (3) y #544 (4); carriles 5 y 6: inmunotransferencias de extracto de hígado de rata (150 µg) (5) y extracto de células L-132 (150 µg) (6) analizadas con el anticuerpo #617.

4.2 Anticuerpos policlonales anti-receptor de LDL

Para la obtención de anticuerpos policlonales anti-receptor de LDL, se inmunizaron conejos con la proteína de fusión GST-LDLR y, a partir de este suero, se purificó el anticuerpo policlonal mediante cromatografía de afinidad en Sepharose-ET15-LDLR. Para fusionar la secuencia del receptor con una secuencia peptídica que contenía 6 residuos contiguos de histidina ("tag" de histidinas) se empleó el plásmido pET-15b (Novagen) que permite clonar, tras una corta secuencia que codifica un péptido de 20 residuos de aminoácidos, 6 de los cuales son residuos contiguos de histidina, el ADN que codifica la proteína. Para inmovilizar covalentemente la proteína de fusión ET15-LDLR se empleó un gel de Sepharose activada con BrCN (Sigma Chemical Co.). El suero del conejo inmunizado con GST-LDLR se diluyó con 9 volúmenes de 10 mM Tris, pH 7.5, se centrifugó durante 10 min a 15,000g, a 4°C y el sobrenadante se aplicó en la columna de Sepharose a la que se había unido covalentemente la proteína ET15-LDLR. Los anticuerpos retenidos se eluyeron con 0.1 M glicina, pH 2.5 y el eluido se neutralizó con 1 M Tris, pH 8.0. La disolución de los anticuerpos específicos purificados se concentró, empleando una unidad de ultrafiltración por centrifugación Centricon, hasta que la concentración de proteína fue mayor de 1 mg/mL. Esta concentración se estimó considerando que una muestra de IgG pura a una concentración de 0.75 mg/mL, situada en una cubeta de 1 cm de paso óptico, exhibe una absorbancia a 280 nm de 1. La disolución de los anticuerpos se dializó frente a PBS y se guardó a -80°C.

4.3 Otros anticuerpos

El anticuerpo monoclonal obtenido en ratón que reconoce proteínas ubicuitiladas (clon FK2) se obtuvo de Affiniti Research Products Limited y el policlonal obtenido en conejo fue cedido amablemente por A. Hershko (Instituto de Tecnología, Haifa, Israel).

Los anticuerpos secundarios IgG anti-ratón y anti-conejo conjugados a fosfatasa alcalina se obtuvieron de Promega Corp., Madison, WI, EE.UU.

Los anticuerpos secundarios IgG anti-ratón y anti-conejo conjugados a peroxidasa o conjugados a isotiocianato de fluoresceína (FITC) fueron obtenidos de Sigma Chemical Co.

5. AISLAMIENTO DE FRACCIONES SUBCELULARES DE HÍGADO DE RATA

5.1 Aislamiento de núcleos, mitocondrias, microsomas y citosol

Los núcleos de hígado de rata fueron purificados por el procedimiento de Sporn *et al.* (1962), con pequeñas modificaciones. Para estos experimentos se utilizaron hígados de ratas alimentadas o sometidas a ayuno durante 20 h. Las ratas se anestesiaron, se sacrificaron por decapitación y se extrajo y pesó el hígado. A partir de aquí, todos los pasos se realizaron a 4°C. El hígado se homogeneizó mediante 30 golpes a una velocidad de 500 rpm en un homogeneizador de teflón-vidrio 853202 (B. Braun) en 0.33 M sacarosa, 4 mM CaCl₂ (30 mL de esta solución/ 10 g de hígado). Tras filtrar el homogeneizado a través de una pieza de nilón (tamaño de poro de 75 µm), se centrifugó a 600g durante 10 min y el precipitado de esta primera centrifugación (fracción nuclear), que está formado por eritrocitos, núcleos, algunas mitocondrias y grandes restos celulares, se resuspendió en 0.25 M sacarosa, 3 mM CaCl₂ primero con un “dedo frío” (tubo de vidrio conteniendo hielo) y luego con 3 golpes, a 500 rpm, en el homogeneizador. El homogeneizado, en un volumen final de 20 mL, se depositó sobre un colchón de igual volumen de 0.34 M sacarosa, 3 mM CaCl₂. Los tubos se centrifugaron durante 15 min a 1,500g en las mismas condiciones que antes y el precipitado se resuspendió, como antes, en 9 volúmenes de 2.4 M sacarosa, 3 mM CaCl₂ y se centrifugó a 45,000g durante 60 min (rotor 60Ti) en una ultracentrífuga L8M de Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, EE.UU. El precipitado de esta centrifugación se resuspendió en 0.25 M sacarosa, 3 mM CaCl₂ y se centrifugó a 600g durante 10 min. Este último sedimento constituye la fracción nuclear.

Las mitocondrias, microsomas y citosol se purificaron a partir del sobrenadante de la centrifugación anterior a 600g. Para purificar las mitocondrias se centrifugó este sobrenadante a 17,700g durante 20 min y el sedimento (la fracción mitocondrial ligera) se resuspendió en 4 mL/g de hígado de solución H (200 mM manitol, 70 mM sacarosa, 1 mM EDTA, 2 mM Hepes-KOH, pH 7.4). El sedimento resuspendido se centrifugó a 4,400g durante 10 min, mientras que el sobrenadante se reservó para la purificación de microsomas y citosol. El precipitado de 4,400g se volvió a suspender en 2 mL/g de hígado de solución H y se centrifugó, de nuevo, a 4,400g durante 10 min. Este precipitado constituye la fracción mitocondrial.

Los microsomas se obtuvieron por centrifugación, a 105,000g durante 1 h (rotor 60 Ti) en una ultracentrífuga L8M de Beckman Instruments Inc., a partir del sobrenadante de una centrifugación previa a 17,000g durante 10 min. Este precipitado constituía la fracción microsomal. El sobrenadante de aquella centrifugación se centrifugó a 150,000g durante 1h y el sobrenadante obtenido constituye la fracción citosólica. Todos los lavados posteriores, tanto del sedimento microsomal como del nuclear, se llevaron a cabo resuspendiéndolos en 10 volúmenes de 0.25 M sacarosa.

5.2 Aislamiento del retículo endoplásmico, rugoso y liso y del complejo de Golgi

Para el aislamiento de retículo endoplásmico, rugoso y liso, el hígado de rata (10 g) se homogeneizó con 30 mL de 0.25 M sacarosa, 5 mM Tris-HCl, pH 8.0, y se centrifugó a 1,000g durante 10 min. El sobrenadante se centrifugó a 10,000g durante 20 min en las mismas condiciones y el sobrenadante resultante se depositó sobre un gradiente discontinuo de sacarosa formado por dos capas, una de 1.5 mL de 0.6 M sacarosa, 15 mM CsCl, 5 mM Tris-HCl, pH 8.0 y

otra de 3 mL de 1.3 M sacarosa, 15 mM CsCl, 5 mM Tris-HCl, pH 8.0. Una vez depositado el sobrenadante de la centrifugación anterior, se realizó una centrifugación a 100,000g durante 90 min (rotor 50Ti) en una ultracentrífuga L8M de Beckman Instruments Inc. El precipitado y la interfase 0.6-1.3 M de sacarosa se resuspendieron, por separado, en 0.25 M sacarosa, 5 mM Tris-HCl, pH 8.0 y se centrifugaron a 160,000g durante 30 min para obtener las fracciones de retículo endoplásmico rugoso y liso, respectivamente.

El complejo de Golgi se purificó a partir de hígado de rata siguiendo el método descrito por Brezt *et al.* (1980), que permite separar sus fracciones *cis* y *trans* en un gradiente discontinuo de 0.25, 0.86, 1.15, 1.35 y 2 M de sacarosa, situándose la fracción *trans* en la interfase 0.25-0.86 M de sacarosa y la *cis* en la interfase 0.86-1.15 M de sacarosa.

La pureza de las fracciones subcelulares se comprobó por medidas de actividades de marcadores enzimáticos propios de cada uno de los compartimientos estudiados y/o mediante visualización al microscopio electrónico (ver por ejemplo la Figura 3 de Resultados). Los marcadores enzimáticos utilizados fueron: β -N-acetil glucosaminidasa (Findlay *et al.*, 1958) y β -hexosaminidasa (Storrie y Madden, 1990) como marcadores lisosomales; ornitina transcarbamilasa (OTC) (Nuzum y Snodgrass, 1976) y succínico deshidrogenasa (SDH) (Bonner, 1955) como marcadores mitocondriales; gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (Bergmeyer *et al.*, 1974) y lactato deshidrogenasa (LDH) (Vassault, 1983) como marcadores citosólicos; α -D-manosidasa (Storrie y Madden, 1990) como enzima marcadora del complejo de Golgi y glucosa-6-fosfatasa (Löhr y Waller, 1983) como enzima marcadora del retículo endoplásmico.

6. "WESTERN-BLOT"

6.1 Obtención de extractos celulares

Para obtener los extractos celulares de fibroblastos humanos o de células CHO-hLDLR, CHO-mock y CHO-C358Y, se dejaron crecer las células en placas de 100 mm de diámetro (Corning Costar Corporation, Cambridge, MA, EE.UU) en las mismas condiciones descritas en los ensayos de degradación de proteínas y en los ensayos de pulso y caza con inmunoprecipitación. Se eliminó el medio de cultivo y se lavaron las células con PBS, se rasparon con ayuda de una goma ("rubber policeman") en PBS y se centrifugaron a 100g durante 10 min a 4°C. Se lisó el sedimento de células en tampón RIPA (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% desoxicolato sódico, 0.1% SDS, 2 mM CaCl₂, 1 mM PMSF y 0.1 mM leupeptina, pH 8, incubando 60 min en hielo y agitando esporádicamente. Después, se centrifugó a 15,000g durante 10 min a 4°C para eliminar restos celulares y se determinó la concentración de proteínas en el sobrenadante.

6.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS e inmunotransferencia

Las proteínas de las diferentes muestras se separaron mediante electroforesis en mini geles verticales (Mini-Protean II, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, Estados Unidos) de poliacrilamida-SDS, según el método de Laemmli (1970), en condiciones de amperaje constante (50 mA). Los porcentajes de acrilamida (Bio-Rad Laboratories) que se utilizaron fueron del 15% para los estudios con los proteasomas y sus subunidades, del 6% para el receptor de LDL y del 6 y 8% para proteínas ubicuítidas. A las muestras se les añadió un volumen de tampón de muestra para electroforesis (125 mM Tris-HCl, 20% glicerol, 5% SDS, 10% 2-mercaptoetanol y 0.2% de

azul de bromofenol, pH 6.8) y se calentaron a 100°C durante 5 min. Los geles se transfirieron electroforéticamente a una membrana de nitrocelulosa (Millipore Corporation, Bedford, MA, EE.UU) durante 16 h a 4 °C, empleando un tanque de transferencia húmeda (Bio-Rad Laboratories) y 25 mM Tris base, 192 mM glicina, pH 8.3. Para verificar la eficacia de las transferencias, las membranas se tiñeron 2 min con 0.5% de rojo Ponceau S (Chemical Co Chemical Co.) en 1% de ácido acético y se destiñeron con PBS, sometiéndose las membranas, a continuación, a un tratamiento durante 1 h con solución bloqueante (5% leche desnatada en polvo, 0.02% azida sódica, en PBS). Posteriormente, las membranas se incubaron con el correspondiente anticuerpo primario (el tiempo, que variaba entre 1-12 h, y la dilución adecuada, se determinaron experimentalmente para cada anticuerpo) en 3% albúmina de suero bovino (BSA) en PBS y 0.02% azida sódica. Seguidamente, las membranas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con el segundo anticuerpo conjugado a fosfatasa alcalina a la dilución indicada por el fabricante. Las proteínas reconocidas específicamente por los anticuerpos se visualizaron mediante incubación con ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP, Sigma Chemical Co.) y cloruro de tetranitrotetrazolio (NBT, Sigma Chemical Co.) en 100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, pH 9.5, por procedimientos estandarizados (Harlow y Lane, 1988) en la detección por fosfatasa alcalina, y con el sistema "ECL" de Amersham Pharmacia.

Las membranas de las inmunotransferencias se analizaron densitométricamente con un densitómetro láser 2202 Ultrosan (Pharmacia) y un integrador 3396 Series II de Hewlett Packard (Palo Alto, CA, EE.UU) y también con una aplicación informática, el Sigma Gel (Jandel Scientific Software, ©1995). En todos los casos se preparaba en paralelo un estándar con cantidades crecientes de la proteína analizada y para la cuantificación sólo se consideraban válidos aquellos valores que estaban dentro del rango de linealidad de la recta patrón.

7. MÉTODOS MORFOLÓGICOS

7.1 Técnicas de ME convencional

En las fracciones subcelulares, todas las muestras, seccionadas en pequeños bloques de 1 mm³ aproximadamente, se fijaron por inmersión, durante 2 h a 4°C, en 2.5% glutaraldehído y 2% formaldehído (Polysciences y Warrington, PA, EE.UU) en 0.1 M cacodilato sódico, 0.1 M sacarosa, 0.1% MgCl₂, 0.05% CaCl₂, pH 7.3, lavándose, posteriormente, durante 12 h a 4°C en el mismo medio sin fijadores. Tras una nueva fijación, durante 45 min a 4°C en oscuridad, esta vez con 1% tetróxido de osmio en tampón veronal-acético 0.1 M, pH 7.3, conteniendo 0.1 M sacarosa, y un lavado de 30 min en una solución de Ringer (150 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂), las muestras se deshidrataron a 4°C en una serie de mezclas de acetona y agua con concentración creciente de acetona (50%, 70% con 0.5% (p/v) de acetato de uranilo y 1% (p/v) de fosfotungstato sódico, 95% y 100%), durante 15 min en cada una, excepto en la del 70% de acetona donde se dejaron las muestras durante 2-4 h o, incluso, toda la noche para conseguir un contraste apropiado de la preparación.

En los cultivos celulares, tras lavar con PBS frío, las células en la monocapa se fijaron 15 min en la placa con una mezcla de 2% (v/v) de glutaraldehído y 1% de formaldehído (Polysciences y Warrington) en 0.05 M cacodilato sódico (pH 7.4). Las células se soltaron de la placa suavemente con "rubber policeman" y se fijaron 45 min más. Se lavaron tres veces durante 30 min con el tampón cacodilato y se fijaron durante 60 min con una mezcla de 1% de tetróxido de osmio (Polysciences y Warrington) y 1% de ferrocianuro potásico. Después, las células se

trataron durante 1 min con 0.15% de ácido tánico en 0.1 M de tampón cacodilato sódico y se lavaron toda la noche en el mismo tampón. Las células fijadas se tiñeron con 2% (p/v) de acetato de uranilo durante 2 h a 20°C y se deshidrataron como se describe arriba.

Tras la infiltración e inclusión en Vestopal W (Serva, Heidelberg, Alemania) para las fracciones subcelulares y en Poly/Bed 812 (Polysciences y Warrington) para los cultivos celulares, por procedimientos estándar (Robards y Wilson, 1993), las piezas se seccionaron en un ultramicrotomo LKB 4801 A de LKB-Microtomy Systems (Leica Cambridge Ltd., Cambridge, Reino Unido) y las secciones ultrafinas se montaron sobre rejillas de cobre (EMscope Laboratories Ltd., Londres, Reino Unido) cubiertas con una película de carbono, obtenida en un evaporador 3MA de Edwards. Tras un contraste adicional con citrato de plomo (Reynolds, 1963), las muestras se observaron en un microscopio electrónico CM-10 de Philips (Eindhoven, Holanda).

Los análisis morfométricos se llevaron a cabo sobre micrografías electrónicas (18 x 24 cm) tomadas al azar a unos aumentos finales de x 10,500, mediante el procedimiento de recuento de puntos, empleando plantillas de sistema test múltiple (Weibel y Bolender, 1973). Para cada medida, el volumen fraccional de lisosomas se estimó analizando 30 micrografías electrónicas procedentes de tres experimentos diferentes. Los lisosomas se identificaron utilizando criterios morfológicos descritos previamente (Knecht *et al.*, 1984).

7.2 Técnicas de fluorescencia

7.2.1 Fluorescencia indirecta

Las células se cultivaron sobre cubreobjetos circulares estériles de 12 mm de diámetro. En el estudio por inmunofluorescencia del efecto del γ -interferón (Sigma Chemical Co.), las células se dejaron crecer durante 2-3 días en presencia o ausencia de 250 unidades/mL del mismo. Se lavaron 3 veces durante 5 min con PBS conteniendo 2 mM $MgCl_2$ (precalentado a 37°C), se fijaron 5 min con metanol (enfriado a -20°C) o 30 min con 3% de paraformaldehído (con posterior permeabilización con 0.01% de saponina). Las células se incubaron con el primer anticuerpo a la dilución apropiada (generalmente 1/100), durante 2 h a temperatura ambiente, o durante toda la noche a 4°C, se lavaron tres veces durante 5 min con PBS y se incubaron durante 1 h con el segundo anticuerpo. Para estos experimentos, se emplearon fragmentos $F(ab')_2$ anti-conejo o anti-ratón conjugados a FITC, a una dilución 1/50. Las diluciones de los anticuerpos, primarios y secundarios, se realizaron en 1% de BSA en PBS. Tras la incubación con el segundo anticuerpo, los cubreobjetos se lavaron tres veces durante 5 min en PBS y se montaron sobre portaobjetos, empleando como líquido de montaje Bacto Fa-Mounting Fluid, pH 7.2 (Difco, Detroit, MI, EE.UU), conteniendo 12.5 $\mu g/mL$ de 4',6-diamidino-2-fenilindol dihidrocloruro (DAPI) (Sigma Chemical Co.) para la tinción del ADN.

7.2.2 Fluorescencia directa

Para determinar la unión e internalización de conjugados de DiI-LDL en células CHO-mock, CHO-hLDLR y CHO-C358Y, se cultivaron estas células sobre cubreobjetos circulares estériles. Se lavaron con PBS a 37°C y se añadió medio Ham's F-12 suplementado con 10% LPDS (suero fetal bovino deficiente en lipoproteínas, preparado según Goldstein *et al.*, 1983) y 1% antibióticos y se preincubaron a 37°C durante 30 min. Para que se produjera la unión y la internalización, los conjugados DiI-LDL (preparados como se describe en Pitas *et al.*, 1981) se añadieron a una concentración final de 9 μg de LDL/mL y se incubaron durante 3 h, al

término de las cuales se lavaron las células 5 veces, durante 3 min, con 2 mg/mL de BSA en PBS, a temperatura ambiente y 2 veces durante 3 min con PBS. Las células se fijaron con una disolución de 3% paraformaldehído en PBS durante 30 min. Tras la fijación, los cubreobjetos se lavaron, 2 veces durante 3 min y se montaron sobre un portaobjetos, empleando como líquido de montaje Bacto Fa-Mounting Fluid, pH 7.2 (Difco).

Todas las preparaciones se examinaron con un Fotomicroscopio III de Zeiss (Carl Zeiss Inc., Oberkochen, Alemania) equipado con un condensador de luz reflejada-fluorescencia III RS y se obtuvieron las imágenes con una cámara automática de formato pequeño (24 x 36 mm). Para las fotografías se empleó una película Kodak T-MAX p3200 (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, EE.UU) y un microscopio Axioskop2 HBO100W de Carl Zeiss Jena GmbH (Jena, Alemania) acoplado a una cámara fotográfica para la toma de imágenes XR-X3000 de Ricoh Company Ltd. (Tokio, Japón).

8. TRANSFECCIONES DE CÉLULAS DE MAMÍFERO

8.1 Obtención de los plásmidos pCMVLDLR y pCMVC358Y

El plásmido empleado en la transfección de células de mamífero con el ADN complementario que codifica el receptor de LDL humano, pCMVLDLR, se obtuvo a partir del pLDLR3 (de 8.4 kb, que a su vez deriva del pLDLR2 descrito por Yamamoto *et al.*, 1984). Este último plásmido fue extraído del cultivo ATCC 57004 (cepa HB101 de *Escherichia coli* transformada con pLDLR3), obtenido de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC). Se purificó el plásmido a partir de una colonia aislada usando columnas y reactivos (Plasmid Midi Kit) de QIAGEN (Izasa, S.A., Barcelona, España). Para subclonar el ADN copia que codifica el receptor en el plásmido pRcCMV, primero se escindió del pLDLR3 mediante cortes con las enzimas de restricción *Xba* I y *Sma* I (Roche Applied Science, Barcelona, España), empleando los protocolos y tampones recomendados por la casa comercial. Esta digestión generó tres fragmentos de restricción de 2.8 (fragmento que codifica el receptor), 1.2 (fragmento 3' terminal del ADN copia que no se traduce) y de 4.4 (el resto del plásmido) kb. Se separaron los fragmentos en un gel de agarosa al 0.7% en tampón Tris-borato-EDTA (10.8 g/mL Tris-base, 5.5 g/L ácido bórico y 4 mL/l 0.5 M EDTA, pH 8), se tiñó en una disolución de 0.5 µg/mL de bromuro de etidio (Sigma Chemical Co.) y se seccionó la porción del gel que contiene la banda que presenta una movilidad electroforética de 2.8 kb. El ADN se extrajo del gel empleando la resina y los reactivos de QIAGEN "QIAEX DNA extraction kit", siguiendo los protocolos descritos por el fabricante. Una vez obtenido, el inserto de 2.8 kb se introdujo en un plásmido intermedio, el pPoly III (Lathe *et al.*, 1987), que había sido abierto previamente con las enzimas de restricción *Xba* I y *Sma* I (Roche Applied Science Molecular Biochemicals) y purificado por el mismo procedimiento. La ligación de ambos fragmentos lineales se llevó a cabo con la ADN ligasa de T4 (Epicentre Technologies, Madison, WI, EE.UU). Una vez obtenido el nuevo plásmido, pPolyLDLR, se empleó para transformar bacterias de la cepa HB101 competentes. Con el fin de subclonar el inserto en pRcCMV (Invitrogen Life Technologies), se purificó el pPolyLDLR y ambos plásmidos se sometieron a digestión con *Hind* III y *Not* I (Roche Applied Science Molecular Biochemicals). Siguiendo los protocolos anteriores, se sometió a electroforesis en un gel de agarosa preparativo y se seccionaron las bandas correspondientes al fragmento de 2.8 kb del plásmido pPolyLDLR (que codifica el receptor humano de las LDL) y el vector pRcCMV abierto. Se extrajeron los fragmentos de

ADN del gel de agarosa y se sometieron a ligación con la ADN ligasa de T4. Con el plásmido obtenido, pCMVLDLR, se transformaron bacterias competentes de la cepa HB101.

El plásmido utilizado para la transfección de células animales con el receptor de LDL que presenta la mutación Cys358Tyr, pCMVC358Y, se obtuvo de una forma similar al plásmido que codifica el receptor normal. El plásmido inicial, pC358Y, fue construido mediante mutagénesis dirigida y posterior subclonación del fragmento mutado en el pLDLR4, que codifica el receptor humano de LDL y que es un vector de expresión derivado del pLDLR3 (Puig, 1996). La mutación consiste en el cambio de A por G en el nucleótido 1,149, que se traduce en el cambio del residuo de Cys, que se encuentra en la posición número 358, por un residuo de Tyr, mediante el empleo del sistema comercial "Altered Sites II" de Promega. Dado que ambos plásmidos presentan el ADN copia del receptor de LDL flanqueado por los mismos sitios de restricción, la estrategia seguida para subclonar en el vector pRcCMV el fragmento que codifica el receptor mutante, fue la misma que se siguió para subclonar el receptor normal. Así, tras cortar el pC358Y con los enzimas de restricción *Xba* I y *Sma* I y obtener el fragmento de 2.8 kb, dicho fragmento se introdujo en el vector pPoly III, del que se volvió a extraer con los enzimas *Hind* III y *Not* I, para posteriormente introducirlo en el plásmido pRcCMV, obteniéndose así pCMVC358Y.

8.2 Transfección permanente de células CHO *ldlA7*

La transfección permanente se realizó según el método del fosfato cálcico (Kingston *et al.*, 1996). Las células CHO *ldlA7* se sembraron en placas de cultivo de 100 mm de diámetro (Corning Costar Corp.), a una densidad de 2×10^5 células por placa. Tras 24 h de cultivo se les añadió 9 mL de medio nuevo.

La disolución del plásmido (de 3 a 6 μ g) se precipitó añadiendo 0.1 volúmenes de 3 M acetato sódico, pH 4.5 y 2.2 volúmenes de etanol frío. Tras lavar el precipitado con etanol al 70%, éste se disolvió en condiciones estériles, en un volumen final de 450 μ L de agua bidestilada a la que se añadieron 50 μ L de 2.5 M CaCl_2 . Se añadió la solución conteniendo el plásmido gota a gota y con suave agitación sobre 500 μ L de tampón HEPES salino (20 mM HEPES, 280 mM NaCl, 1.4 mM Na_2HPO_4 , pH 7.1) y se dejó a temperatura ambiente durante 20 min. La mezcla de transfección (1 mL de volumen total) se repartió homogéneamente por la placa de cultivo, incubándose ésta durante 4 h a 37°C. Después, se retiró el medio de cultivo y se añadieron 2 mL de 10% glicerol en agua, estéril. Tras 3 min a temperatura ambiente se lavaron las células 3 veces con PBS, se añadieron 10 mL de medio completo y se dejaron crecer. Cuando alcanzaron un 80% de confluencia las células se tripsinizaron, sembrándose 3×10^5 células en una placa de 100 mm de diámetro, en medio suplementado con 0.7 mg/mL de geneticina (Invitrogen Life Technologies) y las células que formaron colonias se tripsinizaron y se cultivaron de forma independiente en placas de cultivo de 24 pocillos (Corning Costar Corp.) en presencia de 0.7 mg/mL de geneticina, obteniéndose así líneas celulares en las que se determinó la expresión del gen transfectado LDLR (ver Resultados).

Las colonias seleccionadas se subclonaron mediante dilución, estableciéndose una línea celular a partir de una única célula transfectada. Se comprobó, de nuevo, que los clones seleccionados expresaban el receptor y se expandió la línea celular obtenida, creciendo siempre las células en presencia de geneticina (0.5 mg/mL).

9. EXPERIMENTOS DE PULSO Y CAZA

9.1 Estudios de degradación intracelular de proteínas de vida media corta y de vida media larga

Las diferentes condiciones de crecimiento de los fibroblastos humanos (exponencial, confluyente) fueron establecidas previamente para cada línea celular. Para estudiar la degradación de proteínas de vida media corta, las células se lavaron con tampón fosfato salino (PBS: 72 mM Na₂HPO₄, 28 mM NaH₂PO₄, 26 mM NaCl, pH 7.2) y se incubaron durante 5 min con medio MEM, sin L-Leu o sin L-Val y con suero dializado. Después se añadieron 100 µL de L-[4,5-³H] leucina (1 mCi/mL, 52 Ci/mmol) o de L-[3,4(n)-³H] valina (1 mCi/mL, 45 Ci/mmol) durante los tiempos indicados (ver Resultados). Al terminar el pulso, las células se lavaron rápidamente con PBS a 37°C, suplementado con 2 mM de L-Leu o 10 mM de L-Val, respectivamente, para eliminar el isótopo radiactivo y se incubaron inmediatamente con medio MEM fresco, con o sin suero, suplementado con un exceso de aminoácidos no radiactivos igual que el PBS para evitar la reincorporación de los aminoácidos marcados radiactivamente y liberados por degradación. Para marcar proteínas de vida media larga, se incubaron los fibroblastos humanos durante 48 h en medio completo con 5 µCi/mL de L-[4,5-³H] leucina o de L-[3,4(n)-³H] valina. Antes de empezar a medir la proteólisis, se lavaron las células con PBS suplementado con 2 mM de L-Leu o 10 mM de L-Val y se incubaron 24 h con medio MEM completo también suplementado con 2 mM de L-Leu o 10 mM de L-Val para eliminar las proteínas de vida media corta. Para el ayuno prolongado, las células se lavaron como antes pero en medio sin suero. Para medir la degradación de proteínas las células se incubaron con medio MEM fresco, con o sin suero, conteniendo 2 mM de L-Leu o 10 mM de L-Val. En los experimentos en ausencia de aminoácidos se marcaron y lavaron las células como se describe antes pero sólo con L-[3,4(n)-³H] valina y 10 mM de L-Val. Además, las células se incubaron durante el tiempo de medida de la degradación en medio Krebs-Henseleit (118.4 mM NaCl, 4.75 mM KCl, 1.19 mM KH₂PO₄, 2.54 mM MgSO₄, 2.44 mM CaCl₂ · 2H₂O, 2.85 mM NaCO₃ y 10 mM glucosa pH 7.4) con o sin suero y 10 mM L-Val. Otros detalles se describen en la sección de Resultados.

A los diferentes tiempos de caza, se tomaron dos alícuotas de 250 µL del medio a las que se añadió ácido tricloroacético (TCA) frío (0-4°C) al 5% (concentración final). En los experimentos realizados sin suero se añadió a las alícuotas albúmina de suero bovino (BSA) a 4 mg/mL (concentración final) para ayudar en la precipitación de las proteínas. Los precipitados se disolvieron en NaOH 0.2 N y la radiactividad soluble o insoluble en TCA se midió en un contador de centelleo líquido. Al final del tiempo de incubación, se midió la radiactividad de las células, después de lavar la monocapa de células con 10% de TCA frío durante 30 min y disolverlas con NaOH 0.2 N más 0.4% desoxicolato sódico. El porcentaje de degradación de proteínas se estimó como se describe en Vargas *et al.* (1989) a partir de la radiactividad soluble en TCA liberada al medio a los diferentes tiempos de caza y de la radiactividad precipitable con TCA presente en las células al comienzo de la caza. El porcentaje de proteína liberada al medio se calculó a partir de la radiactividad precipitable con TCA de las correspondientes fracciones. Los resultados finales se expresan como porcentaje de la radiactividad inicial precipitable con TCA presente en las células a los diferentes tiempos de caza (% de la radiactividad remanente presente en las células). Estos valores son calculados por diferencia entre el 100% (radiactividad en las células al tiempo 0) y el porcentaje de degradación de proteínas a cada tiempo. En ocasiones (ver Figura 18 de Resultados) se representa directamente el porcentaje de degradación de proteínas a cada tiempo.

9.2 Procedimientos para calcular las cinéticas de degradación de proteínas de vida media corta y vida media larga a partir de las cinéticas de proteínas marcadas durante un tiempo breve

La degradación de proteínas sigue una cinética exponencial. Por tanto, la desaparición de la marca radiactiva asociada a las proteínas durante un periodo de caza, para un único grupo de proteínas marcadas radiactivamente, viene expresado por la siguiente ecuación:

$$n_t = n_0 \times e^{-kt}$$

donde: n_t y n_0 , representan las proteínas marcadas y presentes al tiempo t de caza o al comienzo de la caza, respectivamente, y k es la velocidad de recambio. Siguiendo el procedimiento descrito en Knecht *et al.* (1980), cuando las curvas de caída de proteínas marcadas durante un tiempo de pulso corto se representan en escala semilogarítmica y se realiza el ajuste por regresión lineal, el mejor ajuste se obtiene para todos los tiempos cuando se consideran dos líneas, indicando que existen dos grandes grupos de proteínas marcadas: las proteínas de vida media corta (VMC) y las proteínas de vida media larga (VML). Por tanto, la curva experimental se descompuso en dos funciones exponenciales: una para proteínas de VML (calculada a partir de los valores de degradación de tiempos de caza más largos 8-24 h, donde las proteínas de vida media corta habrán sido prácticamente degradadas) y otra para VMC (obtenida por extrapolación de la primera línea hasta el tiempo 0 y restándolos a los valores experimentales a los tiempos de caza más cortos: 0-6 h). La intersección de ambas funciones exponenciales con el eje de ordenadas representa la cantidad de proteína marcada al comienzo para los dos grupos de proteínas (n_L y n_S para proteínas de vida media larga y corta, respectivamente).

Las vidas medias ($t_{1/2}$) de ambos grupos ($t_{1/2L}$ y $t_{1/2S}$ para proteínas de vida media larga y corta, respectivamente) se calcularon a partir de los valores de k (k_L y k_S) estimados utilizando la ecuación:

$$t_{1/2} = - (\ln 2)/k$$

Por último, la proporción de proteínas de los dos grupos (N_L y N_S para proteínas de vida media larga y corta, respectivamente) presentes en las células en condiciones de estado estacionario se calculó resolviendo las siguientes ecuaciones (Wheatley *et al.*, 1982 y Corella *et al.*, 1998), donde t es el tiempo de pulso utilizado en el experimento correspondiente:

$$N_L + N_S = 100 \quad N_L = n_L / (1 - 2^{-t/t_{1/2L}}) \quad N_S = n_S / (1 - 2^{-t/t_{1/2S}})$$

9.3 Ensayos de pulso y caza con ^{35}S -Met e inmunoprecipitación en células CHO-hDLR y CHO-C358Y en cultivo

Se sembraron las células a una densidad inicial de 200.000 células/placa de 60 mm y se realizó el ensayo al tercer día de cultivo. Las células se lavaron con 5 mL de PBS a 37°C, durante 5 min y se añadieron 2 mL de medio frío (MEM sin L-Met suplementado con 1 mM L-Gln, 10% FCS dializado y 1% de antibióticos) durante 30 min a 37°C antes de añadir el medio de pulso (el medio frío, conteniendo 50 μCi o 20 μCi de Tran^{35}S -Label) y se incubaron a 37°C durante 15 min o 2 h, respectivamente (ver Resultados). Tras lavar durante 5 min con PBS suplementado con 0.2 mM L-Met a 37°C, se añadió 5 mL de medio normal de cultivo (Ham's F12 con 10% FCS y antibióticos) al que se adicionó 0.2 mM L-Met.

Tras los pulsos y a los diferentes tiempos de caza (ver Resultados), se eliminó el medio y se lavaron las células 2 veces con 2 mL de PBS, 0.2 mM L-Met, a 4°C. Se añadieron 500 μL /placa de tampón RIPA a 4°C y se incubaron 1.5 h sobre hielo. Posteriormente, se recogió el lisado en un tubo de microfuga que contenía 100 μL de Sepharose 6B y 5 μL de proteína A-Sepharose (equilibradas 1:1 (v/v) en tampón NET: 0.05 M Tris, 150 mM NaCl, 0.1% BSA, 0.1% SDS, 0.1% desoxicolato sódico, 0.5% Nonidet P-40, 2 mM CaCl_2 , 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cloranfenicol, pH 7.0). Por último, se lavó la placa con 250 μL de RIPA que se añadió al mismo tubo, se incubó 1 h a 4°C en agitación y se centrifugó 5 min en microfuga. Del sobrenadante se tomaron 600 μL en un tubo que contenía 18 μL del complejo del anticuerpo policlonal-proteína A-Sepharose (0.5 mg de IgG por cada mililitro de suspensión de proteína A-Sepharose), y se incubó a 4 °C durante 16 h con agitación. Tras centrifugar 10 min en microfuga, el sedimento se lavó 5 veces con 900 μL tampón NET a 4°C y se añadió 20 μL de una disolución de 8 M urea y 0.2 M ditiotreitól y 25 μL de tampón de carga reductor. Tras calentar 7 minutos a 95°C, las muestras se aplicaron en un PAGE-SDS del 6% de poliacrilamida y los geles se procesaron para fluorografía. Para ello, los geles se fijaron durante 1 hora en 45% metanol y 7.5% ácido acético, y se sumergieron en DMSO 2 veces durante 30 min. Después, los geles se pasaron a una disolución de 22.2% 2,5-difeniloxazol (PPO) en DMSO (p/v) durante 3 h y se equilibraron en agua bidestilada durante 1 h más. Finalmente, los geles se secaron en un secador de geles por aire (GelAir Drying, Bio-Rad Laboratories) y se expusieron a -80°C, dentro de una carpeta reflectante, utilizando una película X-OMAT S100 (Kodak Ltd., Hemel Hempstead, Reino Unido). Los tiempos de exposición variaron, en función de la radiactividad, entre 2-7 días. La radiactividad asociada a las bandas se cuantificó mediante una aplicación informática, el Sigma Gel (Jandel Scientific Software, ©1995) y mediante un Phosphorimager, el Fla-2000 Fuji Photo Film Co. (Tokio, Japón).

10. OTROS MÉTODOS

La cantidad de proteína en las muestras se determinó por el método de Lowry-desoxicolato (Harris, 1987). El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante el test t de Student. La aplicación informática empleada para el tratamiento gráfico y estadístico fue: Microsoft PowerPoint 4.0 y Microsoft Excel 5.0 (Microsoft Corporation, ©1997) y GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, Inc).

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, J., Behnke, M., Chen, S., Cruickshank, A. A., Dick, L. R., Grenier, L., Klunder, J. M., Ma, Y. T., Plamondon, L., Stein, R. L. (1998). Potent and selective inhibitors of the proteasome: dipeptidyl boronic acids. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **8**, 333-338.
- Agarraberes, F. A., Dice, J. F. (2001). A molecular chaperone complex at the lysosomal membrane is required for protein translocation. *J. Cell Sci.* **114**, 2491-2499.
- Agarraberes, F. A., Terlecky, S. R., Dice, J. F. (1997). An intralysosomal hsp70 is required for a selective pathway of lysosomal protein degradation. *J. Cell Biol.* **137**, 825-834.
- Ahn, K., Erlander, M., Leturcq, D., Peterson, P. A., Fruh, K., Yang, Y. (1996). *In vivo* characterization of the proteasome regulator PA28. *J. Biol. Chem.* **271**, 18237-18242.
- Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., Salvesen, G., Thornberry, N. A., Wong, W. W., Yuan, J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell.* **87**, 171.
- Aniento, F., Roche, E., Cuervo, A. M., Knecht, E. (1993). Uptake and degradation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by rat liver lysosomes. *J. Biol. Chem.* **268**, 10463-10470.
- Arrigo, A. P., Simon, M., Darlix, J. L., Spahr, P. F. (1987). A 20S particle ubiquitous from yeast to human. *J. Mol. Evol.* **25**, 141-150.
- Atkins, A. R., Brereton, I. M., Kroon, P. A., Lee, H. T., Smith, R. (1998). Calcium is essential for the structural integrity of the cysteine-rich, ligand-binding repeat of the low-density lipoprotein receptor. *Biochemistry.* **37**, 1662-1670.
- Attaix, D., Combaret, L., Tilignac, T., Taillandier, D. (1999). Adaptation of the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway in cancer cachexia. *Mol. Biol. Rep.* **26**, 77-82.
- Bartek, J., Lukas, J. (2001). Cell cycle. Order from destruction. *Science.* **294**, 66-67.
- Baumeister, W., Dahlmann, B., Hegerl, R., Kopp, F., Kuehn, L., Pfeifer, G. (1988). Electron microscopy and image analysis of the multicatalytic proteinase. *FEBS Lett.* **241**, 239-245.
- Belich, M. P., Glynne, R. J., Senger, G., Sheer, D., Trowsdale, J. (1994). Proteasome components with reciprocal expression to that of the MHC-encoded LMP proteins. *Curr. Biol.* **4**, 769-776.
- Bence, N. F., Sampat, R. M., Kopito, R. R. (2001). Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science.* **292**, 1552-1555.
- Bergmeyer, H. U., Gawehen, K., Grasse, M. (1974). Enzymes as biochemical reagents. En: *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H. U., ed.) 2nd ed., vol. 1, pp. 466-467, Academic Press, New York.
- Bertolini, S., Cassanelli, S., Garuti, R., Ghisellini, M., Simone, M.L., Rolleri, M., Masturzo, P., Calandra, S. (1999). Analysis of LDL receptor gene mutations in Italian patients with homozygous familial hypercholesterolemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **19**, 408-418.

- Beyette, J., Mason, G. G., Murray, R. Z., Cohen, G. M., Rivett, A. J. (1998). Proteasome activities decrease during dexamethasone-induced apoptosis of thymocytes. *Biochem. J.* **332**, 315-320.
- Blagosklonny, M. V., An, W. G., Melillo, G., Nguyen, P., Trepel, J. B., Neckers, L. M. (1999). Regulation of BRCA1 by protein degradation. *Oncogene*. **18**, 6460-6468.
- Blommaert, E. F., Krause, U., Schellens, J. P., Vreeling-Sindelarova, H., Meijer, A. J. (1997). The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* **243**, 240-246.
- Bohley, P., Seglen, P. O. (1992). Proteases and proteolysis in the lysosome. *Experientia*. **48**, 151-157.
- Bonner, W. D. (1955). Succinic dehydrogenase. *Methods Enzymol.* **1**, 722-729.
- Bossis, G., Ferrara, P., Acquaviva, C., Jariel-Encontre, I., Piechaczyk, M. (2003). c-Fos proto-oncoprotein is degraded by the proteasome independently of its own ubiquitinylation in vivo. *Mol. Cell Biol.* **23**, 7425-7436.
- Bota, D. A., Davies, K. J. A. (2001). Protein degradation in mitochondria: implications for oxidative stress, aging and disease: a novel etiological classification of mitochondrial proteolytic disorder. *Mitochondrion*. **1**, 33-49.
- Braun, B. C., Glickman, M., Kraft, R., Dahlmann, B., Kloetzel, P. M., Finley, D., Schmidt, M. (1999). The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. *Nat. Cell Biol.* **1**, 221-226.
- Bretz, R., Bretz, H., Palade, G. E. (1980). Distribution of terminal glycosyltransferases in hepatic Golgi fractions. *J. Cell Biol.* **84**, 87-101.
- Brix, K., Linke, M., Tepel, C., Herzog, V. (2001). Cysteine proteinases mediate extracellular prohormone processing in the thyroid. *Biol. Chem.* **382**, 717-725.
- Brooks, P., Fuertes, G., Murray, R.Z., Bose, S., Knecht, E., Rechsteiner, M. C., Hendil, K. B., Tanaka, K., Dyson, J., Rivett, A. J. (2000). Subcellular localization of proteasomes and their regulatory complexes in mammalian cells. *Biochem J.* **346**, 155-161.
- Brown, C. K., Madauss, K., Lian, W., Beck, M. R., Tolbert, W. D., Rodgers, D. W. (2001). Structure of neurolysin reveals a deep channel that limits substrate access. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 3127-3132.
- Brown, M. S., Goldstein, J. L. (1986). A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*. **232**, 34-47.
- Brown, M. S., Goldstein, J. L. (1997). The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell*. **89**, 331-340.

- Brown, M. S., Herz, J., Goldstein, J. L. (1997). Calcium cages, acid baths and recycling receptors. *Nature*. **388**, 629-630.
- Carafoli, E., Molinari, M. (1998). Calpain: a protease in search of a function? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **247**, 193-203.
- Casciola, L. A., Grant, K. I., Gevers, W., Coetzee, G. A., van der Westhuyzen, D. R. (1989). Low-density-lipoprotein receptors in human fibroblasts are not degraded in lysosomes. *Biochem. J.* **262**, 681-683.
- Ceccarelli, E., Mann, C. (2001). A cdc28 mutant uncouples G1 cyclin phosphorylation and ubiquitination from G1 cyclin proteolysis. *J. Biol. Chem.* **276**, 41725-41732.
- Chen, W. J., Goldstein, J. L., Brown, M. S. (1990). NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low density lipoprotein receptor. *J. Biol. Chem.* **265**, 3116-3123.
- Chew, A., Sirugo, G., Alsobrook, J. P., Isaya, G. (2000). Functional and genomic analysis of the human mitochondrial intermediate peptidase, a putative protein partner of frataxin. *Genomics*. **65**, 104-112.
- Chowdary, D. R., Dermody, J. J., Jha, K. K., Ozer, H. L. (1994). Accumulation of p53 in a mutant cell line defective in the ubiquitin pathway. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 1997-2003.
- Ciechanover, A., Shkedy, D., Oren, M., Bercovich, B. (1994). Degradation of the tumor suppressor protein p53 by the ubiquitin-mediated proteolytic system requires a novel species of ubiquitin-carrier protein, E2. *J. Biol. Chem.* **269**, 9582-9589.
- Cohen, J. C., Kimmel, M., Polanski, A., Hobbs, H. H. (2003). Molecular mechanisms of autosomal recessive hypercholesterolemia. *Curr. Opin. Lipidol.* **14**, 121-7.
- Combaret, L., Tilignac, T., Claustre, A., Voisin, L., Taillandier, D., Obled, C., Tanaka, K., Attaix, D. (2002). Torbafylline (HWA 448) inhibits enhanced skeletal muscle ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis in cancer and septic rats. *Biochem. J.* **361**, 185-192.
- Corella, D., Guillen, M., Hernández, J. M., Hernández-Yago, J. (1998). Effects of polyamine levels on the degradation of short-lived and long-lived proteins in cultured L-132 human lung cells. *Biochem. J.* **334**, 367-375.
- Coux, O., Tanaka, K., Goldberg, A. L. (1996). Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 801-847.
- Craiu, A., Gaczynska, M., Akopian, T., Gramm, C. F., Fenteany, G., Goldberg, A. L., Rock, K. L. (1997). Lactacystin and clasto-lactacystin beta-lactone modify multiple proteasome beta-subunits and inhibit intracellular protein degradation and major histocompatibility complex class I antigen presentation. *J. Biol. Chem.* **272**, 13437-13445.
- Cuervo, A. M., Dice, J. F. (1998). Lysosomes, a meeting point of proteins, chaperones, and proteases. *J. Mol. Med.* **76**, 6-12.

- Cuervo, A. M., Knecht, E., Terlecky, S. R., Dice, J. F. (1995a). Activation of a selective pathway of lysosomal proteolysis in rat liver by prolonged starvation. *Am. J. Physiol.* **269**, C1200-C1208.
- Cuervo, A. M., Palmer, A., Rivett, A. J., Knecht, E. (1995b). Degradation of proteasomes by lysosomes in rat liver. *Eur. J. Biochem.* **227**, 792-800.
- Cuervo, A. M., Dice, J. F., Knecht, E. (1997). A population of rat liver lysosomes responsible for the selective uptake and degradation of cytosolic proteins. *J. Biol. Chem.* **272**, 5606-5615.
- Cuervo, A. M., Mann, L., Bonten, E. J., d'Azzo, A., Dice, J. F. (2003). Cathepsin A regulates chaperone-mediated autophagy through cleavage of the lysosomal receptor. *EMBO J.* **22**, 47-59.
- Davis, C. G., Goldstein, J. L., Sudhof, T. C., Anderson, R. G., Russell, D. W., Brown, M. S. (1987). Acid-dependent ligand dissociation and recycling of LDL receptor mediated by growth factor homology region. *Nature* . **326**, 760-765.
- DeMartino, G. N., Proske, R. J., Moomaw, C. R., Strong, A. A., Song, X., Hisamatsu, H., Tanaka, K., Slaughter, C. A. (1996). Identification, purification, and characterization of a PA700-dependent activator of the proteasome. *J. Biol. Chem.* **271**, 3112-3118.
- Deng, K., Shenoy, S. K., Tso, S. C., Yu, L., Yu, C. A. (2001). Reconstitution of mitochondrial processing peptidase from the core proteins (subunits I and II) of bovine heart mitochondrial cytochrome bc(1) complex. *J. Biol. Chem.* **276**, 6499-6505.
- DePierre, J. W., Anderson, G., Dallner, G. (1988) Endoplasmic reticulum and Golgi complex. En: *The Liver: Biology and Pathology* (Arias, I. M., Jacoby, W. B., Popper, H., Schachter, D., Shafritz, D., eds.) 2nd ed., pp. 165-187, Raven Press, New York.
- Deveraux, Q., Ustrell, V., Pickart, C., Rechsteiner, M. (1994). A 26S protease subunit that binds ubiquitin conjugates. *J. Biol. Chem.* **269**, 7059-7061.
- Dice, J. F. (1990). Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trends Biochem. Sci.* **15**, 305-309.
- Dice, J. F. (2000). *Lysosomal Pathways of Protein Degradation* . Landes Bioscience, Georgetown, TX.
- Dick, L. R., Cruikshank, A. A., Grenier, L., Melandri, F. D., Nunes, S. L., Stein, R. L. (1996). Mechanistic studies on the inactivation of the proteasome by lactacystin: a central role for clasto-lactacystin beta-lactone. *J. Biol. Chem.* **271**, 7273-7276.
- Doherty, F. J., Mayer, R. J. (1992). *Intracellular Protein Degradation*, Oxford University Press, New York.
- Driscoll, J., Brown, M. G., Finley, D., Monaco, J. J. (1993). MHC-linked LMP gene products specifically alter peptidase activities of the proteasome. *Nature.* **365**, 262-264.

- Dunn, W. A. Jr. (1990). Studies on the mechanisms of autophagy: formation of the autophagic vacuole. *J. Cell Biol.* **110**, 1923-1933.
- Enenkel, C., Lehmann, A., Kloetzel, P. M. (1998). Subcellular distribution of proteasomes implicates a major location of protein degradation in the nuclear envelope-ER network in yeast. *EMBO J.* **17**, 6144-6154.
- Esser, V., Limbird, L. E., Brown, M. S., Goldstein, J. L., Russell, D. W. (1988). Mutational analysis of the ligand binding domain of the low density lipoprotein receptor. *J. Biol. Chem.* **263**, 13282-13290.
- Fenteany, G., Standaert, R. F., Lane, W. S., Choi, S., Corey, E. J., Schreiber, S. L. (1995). Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. *Science.* **268**, 726-731.
- Findlay, J., Levvy, G. A., Marsh, C. A. (1958). Inhibition of glycosidases by aldonolactones of corresponding configuration. 2. Inhibitors of beta-N-acetylglucosaminidase. *Biochem. J.* **69**, 467-476.
- Fourie, A. M., Coetzee, G. A., Gevers, W., van der Westhuyzen, D. R. (1992). Low-density lipoprotein receptor point mutation results in expression of both active and inactive surface forms of the same mutant receptor. *Biochemistry.* **31**, 1275-1279.
- Fuertes, G., Villarroya, A., Knecht, E. (2003a). Role of proteasomes in the degradation of short-lived proteins in human fibroblasts under various growth conditions. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **35**, 651-664.
- Fuertes, G., Martin De Llano, J. J., Villarroya, A., Rivett, A. J., Knecht, E. (2003b). Changes in the proteolytic activities of proteasomes and lysosomes in human fibroblasts produced by serum withdrawal, amino-acid deprivation and confluent conditions. *Biochem. J.* **375**, 75-86.
- Fukuhara, C., Dirden, J. C., Tosini, G. (2001). Photic regulation of melatonin in rat retina and the role of proteasomal proteolysis. *Neuroreport.* **12**, 3833-3837.
- Gaczynska, M., Rock, K. L., Goldberg, A. L. (1993). Gamma-interferon and expression of MHC genes regulate peptide hydrolysis by proteasomes. *Nature.* **365**, 264-267.
- Gaczynska, M., Rock, K. L., Spies, T., Goldberg, A. L. (1994). Peptidase activities of proteasomes are differentially regulated by the major histocompatibility complex-encoded genes for LMP2 and LMP7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 9213-9217.
- Gandre, S., Bercovich, Z., Kahana, C. (2002). Ornithine decarboxylase-antizyme is rapidly degraded through a mechanism that requires functional ubiquitin-dependent proteolytic activity. *Eur. J. Biochem.* **269**, 1316-1322.
- Garber, K. (2002). Cancer research. Taking garbage in, tossing cancer out? *Science.* **295**, 612-613.

- Geier, E., Pfeifer, G., Wilm, M., Lucchiari-Hartz, M., Baumeister, W., Eichmann, K., Niedermann, G. (1999). A giant protease with potential to substitute for some functions of the proteasome. *Science*. **283**, 978-981.
- Glading, A., Lauffenburger, D. A., Wells, A. (2002). Cutting to the chase: calpain proteases in cell motility. *Trends Cell Biol.* **12**, 46-54.
- Glaumann, H. (1989). Crinophagy as a means for degrading excess secretory proteins in rat liver. En: *Current Trends in the Study of Intracellular Protein Degradation*. (Knecht, E., Grisolia, S., eds.) vol I, pp 97-110, Springer International, Vizcaya.
- Glickman, M. H., Ciechanover, A. (2002). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev.* **82**, 373-428.
- Glickman, M. H., Rubin, D. M., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Baumeister, W., Fried, V. A., Finley, D. (1998). A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell*. **94**, 615-623.
- Glickman, M. H., Rubin, D. M., Fu, H., Larsen, C. N., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Vierstra, R., Baumeister, W., Fried, V., Finley, D. (1999). Functional analysis of the proteasome regulatory particle. *Mol. Biol. Rep.* **26**, 21-28.
- Glotzer, M., Murray, A. W., Kirschner, M. W. (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature*. **349**, 132-138.
- Glynne, R., Powis, S. H., Beck, S., Kelly, A., Kerr, L. A., Trowsdale, J. (1991). A proteasome-related gene between the two ABC transporter loci in the class II region of the human MHC. *Nature*. **353**, 357-360.
- Goldberg, A. L. (1995). Functions of the proteasome: the lysis at the end of the tunnel. *Science*. **268**, 522-523.
- Goldberg, A. L., St John, A. C. (1976). Intracellular protein degradation in mammalian and bacterial cells: Part 2. *Annu. Rev. Biochem.* **45**, 747-803.
- Goldberg A. L., Cascio P., Saric T., Rock K. L. (2002). The importance of the proteasome and subsequent proteolytic steps in the generation of antigenic peptides. *Mol. Immunol.* **39**, 147-164.
- Goldstein, J. L., Basu, S. K., Brown, M. S. (1983). Receptor-mediated endocytosis of low-density lipoprotein in cultured cells. *Meth. Enzymol.* **98**, 241-260.
- Goldstein, J. L., Hobbs, H. H., Brown, M. S. (1995). Familial hypercholesterolemia. En: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (Scriver, C. S., Beaudet, A. L., Sly, W. S., Valle, D., eds.) 8th ed., vol. 2, pp. 1981-2030. McGraw Hill, New York.
- Gordon C. (2002). The intracellular localization of the proteasome. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **268**, 175-184.

- Gordon, P. B., Seglen, P. O. (1989). Exogenous control of intracellular protein catabolism. En: *Proteolytic Enzymes: A Practical Approach* (Beynon, R. J., Bond, J. S. eds.), pp. 201-210, IRL Press, Oxford.
- Grant, K. I., Casciola, L. A., Coetzee, G. A., Sanan, D. A., Gevers, W., van der Westhuyzen, D. R. (1990). Ammonium chloride causes reversible inhibition of low density lipoprotein receptor recycling and accelerates receptor degradation. *J. Biol. Chem.* **265**, 4041-4047.
- Griffin, T. A., Nandi, D., Cruz, M., Fehling, H. J., Kaer, L. V., Monaco, J. J., Colbert, R. A. (1998). Immunoproteasome assembly: cooperative incorporation of interferon gamma (IFN-gamma)-inducible subunits. *J. Exp. Med.* **187**, 97-104.
- Groettrup, M., Soza, A., Eggers, M., Kuehn, L., Dick, T. P., Schild, H., Rammensee, H. G., Koszinowski, U. H., Kloetzel, P. M. (1996). A role for the proteasome regulator PA28alpha in antigen presentation. *Nature.* **381**, 166-168.
- Grziwa, A., Baumeister, W., Dahlmann, B., Kopp, F. (1991). Localization of subunits in proteasomes from *Thermoplasma acidophilum* by immunoelectron microscopy. *FEBS Lett.* **290**, 186-190.
- Hare, J. F. (1990). Compartmentation and turnover of the low density lipoprotein receptor in skin fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **265**, 21758-21763.
- Harlow, E., Lane, D. (1988). *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Harris, D. A. (1987). Spectrophotometric assays. En: *Spectrophotometry and Spectrofluorimetry: A Practical Approach* (Harris, D. A., Bashford, C. L., Eds.), pp. 49-90. IRL Press, Oxford.
- Hegerl, R., Pfeifer, G., Puhler, G., Dahlmann, B., Baumeister, W. (1991). The three-dimensional structure of proteasomes from *Thermoplasma acidophilum* as determined by electron microscopy using random conical tilting. *FEBS Lett.* **283**, 117-121.
- Henderson, H. E., Berger, G. M., Marais, A. D. (1988). A new LDL receptor gene deletion mutation in the South African population. *Hum. Genet.* **80**, 371-374.
- Hendil, K. B., Khan, S., Tanaka, K. (1998). Simultaneous binding of PA28 and PA700 activators to 20S proteasomes. *Biochem. J.* **332**, 749-754.
- Hendil, K. B., Hartmann-Petersen, R., Tanaka, K. (2002). 26S proteasomes function as stable entities. *J. Mol. Biol.* **315**, 627-636.
- Hilt, W., Wolf, D. H., eds. (2001). *Proteasomes: The World of Regulatory Proteolysis*. Landes Bioscience, Georgetown, TX.
- Hirayama, T, Yamaki, E, Hata, A, Tsuji, M, Hashimoto, K, Yamamoto, M, Emi, M. (1998). Five familial hypercholesterolemic kindreds in Japan with novel mutations of the LDL receptor gene. *J. Hum. Genet.* **43**, 250-254.

- Hobbs, H. H., Russell, D. W., Brown, M. S., Goldstein, J. L. (1990). The LDL receptor locus and familial hypercholesterolemia: Mutational analysis of a membrane protein. *Annu. Rev. Genet.* **24**, 133-170.
- Huang, Y., Wang, K. K. (2001). The calpain family and human disease. *Trends Mol. Med.* **7**, 355-362.
- Hughes, E. A., Hammond, C., Cresswell, P. (1997). Misfolded major histocompatibility complex class I heavy chains are translocated into the cytoplasm and degraded by the proteasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 1896-1901.
- Hungness, E. S., Robb, B. W., Luo, G. J., Pritts, T. A., Hershko, D. D., Hasselgren, P. O. (2002). Proteasome inhibitors activate the transcription factors C/EBP-beta and delta in human intestinal epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **290**, 469-474.
- Inubushi, T., Shikiji, M., Endo, K., Kakegawa, H., Kishino, Y., Katunuma, N. (1996). Hormonal and dietary regulation of lysosomal cysteine proteinases in liver under gluconeogenesis conditions. *Biol. Chem.* **377**, 539-542.
- Isaya, G., Miklos, D., Rollins, R. A. (1994). MIP1, a new yeast gene homologous to the rat mitochondrial intermediate peptidase gene, is required for oxidative metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **14**, 5603-5616.
- Itoh, K., Kase, R., Shimmoto, M., Satake, A., Sakuraba, H., Suzuki, Y. (1995). Protective protein as an endogenous endothelin degradation enzyme in human tissues. *J. Biol. Chem.* **270**, 515-518.
- Jan, P. S., Esser, K., Pratje, E., Michaelis, G. (2000). Som1, a third component of the yeast mitochondrial inner membrane peptidase complex that contains Imp1 and Imp2. *Mol. Gen. Genet.* **263**, 483-491.
- Joazeiro, C. A., Wing, S. S., Huang, H., Levenson, J. D., Hunter, T., Liu, Y. C. (1999). The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent ubiquitin-protein ligase. *Science.* **286**, 309-312.
- Kidd, V. J., Lahti, J. M., Teitz, T. (2000). Proteolytic regulation of apoptosis. *Semin. Cell Dev. Biol.* **11**, 191-201.
- Kihara, A., Noda, T., Ishihara, N., Ohsumi, Y. (2001). Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase, sorting in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **152**, 519-530.
- Kim, J., Klionsky, D. J. (2000). *Autophagy*, cytoplasm-to-vacuole targeting pathway, and pexophagy in yeast and mammalian cells. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 303-342.
- Kingston, R. E., Chen, C. A., Okayama, H. (1996). Calcium phosphate transfection. En: *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K., eds.), vol. 1, pp. 9.1.4-9.1.9. Wiley, Chichester.

- Klionsky, D. J., Emr, S. D. (2000). Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science*. **290**, 1717-1721.
- Kloetzel, P. M. (2001). Antigen processing by the proteasome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 179-187.
- Knecht, E., Rivett, A. J. (2000). Intracellular localization of proteasomes. En: *Proteasomes: The World of Regulatory Proteolysis* (Hilt, W., y Wolf, D., eds.), pp. 181-193, Landes Bioscience, Georgetown, TX.
- Knecht, E., Hernández-Yago, J., Martínez-Ramón, A., Grisolia, S. (1980). Fate of proteins synthesized in mitochondria of cultured mammalian cells revealed by electron microscope radioautography. *Exp. Cell Res.* **125**, 191-199.
- Knecht, E., Hernández-Yago, J., Grisolia, S. (1984). Regulation of lysosomal autophagy in transformed and non-transformed mouse fibroblasts under several growth conditions. *Exp. Cell Res.* **154**, 224-232.
- Knecht, E., Palmer, A., Sweeney, S. T., Rivett, A. J. (1991). Immunocytochemical localization of the multicatalytic proteinase in rat liver and in L-132 cells. *Biochem. Soc. Trans.* **19**, 293S.
- Knecht, E., Martín de Llano, J. J., Andreu, E., Moreno Miralles, I. (1998). Pathways for the degradation of intracellular proteins within lysosomes in higher eukaryotes. *Adv. Mol. Cell Biol.* **27**, 201-234.
- Knowlton, J. R., Johnston, S. C., Whitby, F. G., Realini, C., Zhang, Z., Rechsteiner, M., Hill, C. P. (1997). Structure of the proteasome activator REGalpha (PA28alpha). *Nature*. **390**, 639-643.
- Kozarsky, K. F., Brush, H. A., Krieger, M. (1986). Unusual forms of low density lipoprotein receptors in hamster cell mutants with defects in the receptor structural gene. *J. Cell. Biol.* **102**, 1567-1575.
- Krieger, M. (1998). The "best" of cholesterol, the "worst" of cholesterol: a tale of two receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 4077-4080.
- Kristensen, P., Johnsen, A. H., Uerkevitz, W., Tanaka, K., Hendil, K. B. (1994). Human proteasome subunits from 2-dimensional gels identified by partial sequencing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **205**, 1785-1789.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**, 680-685.
- Langer, T., Kaser, M., Klanner, C., Leonhard, K. (2001). AAA proteases of mitochondria: quality control of membrane proteins and regulatory functions during mitochondrial biogenesis. *Biochem. Soc. Trans.* **29**, 431-436.

- Larbaud, D., Balage, M., Taillandier, D., Combaret, L., Grizard, J., Attaix, D. (2001). Differential regulation of the lysosomal, Ca²⁺-dependent and ubiquitin/proteasome-dependent proteolytic pathways in fast-twitch and slow-twitch rat muscle following hyperinsulinaemia. *Clin. Sci. (Lond.)*. **101**, 551-558.
- Lathe, R., Vilotte, J. L., Clark, A. J. (1987). Plasmid and bacteriophage vectors for excision of intact inserts. *Gene*. **57**, 193-201.
- Lee, D. H., Goldberg, A. L. (2001). The proteasome inhibitors and their uses. En: *Proteasomes: The World of Regulatory Proteolysis* (Hilt, W., y Wolf, D., eds.), pp. 154-175, Landes Bioscience, Georgetown, TX.
- Leist, M., Jaattela, M. (2001). Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 589-598.
- Leonhard, K., Herrmann, J. M., Stuart, R. A., Mannhaupt, G., Neupert, W., Langer, T. (1996). AAA proteases with catalytic sites on opposite membrane surfaces comprise a proteolytic system for the ATP-dependent degradation of inner membrane proteins in mitochondria. *EMBO J.* **15**, 4218-4229.
- Lestavel, S., Fruchart, J. C. (1994). Lipoprotein receptors. *Cell Mol. Biol.* **40**, 461-481.
- Levkowitz, G., Waterman, H., Ettenberg, S. A., Katz, M., Tsygankov, A. Y., Alroy, I., Lavi, S., Iwai, K., Reiss, Y., Ciechanover, A., Lipkowitz, S., Yarden, Y. (1999). Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1. *Mol. Cell.* **4**, 1029-1040.
- Löhr, G. W., Waller, H. D. (1983). En: *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H. U., ed.) 3rd ed., vol. 3, pp. 118-126, Verlag Chemie, Weinheim.
- Los, M., Mozoluk, M., Ferrari, D., Stepczynska, A., Stroh, C., Renz, A., Herceg, Z., Wang, Z. Q., Schulze-Osthoff, K. (2002). Activation and caspase-mediated inhibition of PARP: A molecular switch between fibroblast necrosis and apoptosis in death receptor signaling. *Mol. Biol. Cell.* **13**, 978-988.
- Löw, P., Doherty, F. J., Fellingner, E., Sass, M., Mayer, R. J., Laszlo, L. (1995). Related organelles of the endosome-lysosome system contain a different repertoire of ubiquitinated proteins in Sf9 insect cells. *FEBS Lett.* **368**, 125-131.
- Löwe, J., Stock, D., Jap, B., Zwickl, P., Baumeister, W., Huber, R. (1995). Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *Thermoplasma acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science*. **268**, 533-539.
- Ma, Y., Hendershot, L. M. (2001). The unfolding tale of the unfolded protein response. *Cell*. **107**, 827-830.
- Malek, N. P., Sundberg, H., McGrew, S., Nakayama, K., Kyriakides, T. R., Roberts, J. M., Kyriakidis, T. R. (2001). A mouse knock-in model exposes sequential proteolytic pathways that regulate p27Kip1 in G1 and S phase. *Nature*. **413**, 323-327.

- Martín de Llano, J.J., Andreu, E.J. y Knecht, E. (1996). Use of Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry for the quantitation of the binding and uptake of colloidal gold-low density lipoprotein conjugates by cultured cells. *Anal. Biochem.* **243**, 210-217.
- Martin de Llano, J. J., Andreu, E. J., Pastor, A., de la Guardia, M., Knecht E. (2000). Electrothermal atomic absorption spectrometric diagnosis of familial hypercholesterolemia. *Anal Chem.* **72**, 2406-2413.
- Mason, G. G., Murray, R. Z., Pappin, D., Rivett, A. J. (1998). Phosphorylation of ATPase subunits of the 26S proteasome. *FEBS Lett.* **430**, 269-274.
- Mayer, R. J., Doherty, F. (1986). Intracellular protein catabolism: state of the art. *FEBS Lett.* **198**, 181-193.
- Melman, L., Geuze, H. J., Li, Y., McCormick, L. M., Van Kerkhof, P., Strous, G. J., Schwartz, A. L., Bu, G. (2002). Proteasome regulates the delivery of LDL receptor-related protein into the degradation pathway. *Mol Biol Cell.* **13**, 3325-3335.
- Meng, L., Mohan, R., Kwok, B. H., Elofsson, M., Sin, N., Crews, C. M. (1999). Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits *in vivo* antiinflammatory activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 10403-10408.
- Miura, H., Tomoda, H., Miura, K., Takishima, K., Omura, S. (1996). Lactacystin increases LDL receptor level on HepG2 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **227**, 684-687.
- Mizushima, N., Yamamoto, A., Hatano, M., Kobayashi, Y., Kabeya, Y., Suzuki, K., Tokuhiya, T., Ohsumi, Y., Yoshimori, T. (2001). Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J. Cell Biol.* **152**, 657-668.
- Molinari, M., Carafoli, E. (1997). Calpain: a cytosolic proteinase active at the membranes. *J. Membr. Biol.* **156**, 1-8.
- Mori, S., Heldin, C. H., Claesson-Welsh, L. (1992). Ligand-induced polyubiquitination of the platelet-derived growth factor beta-receptor. *J. Biol. Chem.* **267**, 6429-6434.
- Mortimore, G. E., Lardeux, B. R., Adams, C. E. (1988). Regulation of microautophagy and basal protein turnover in rat liver. Effects of short-term starvation. *J. Biol. Chem.* **263**, 2506-2512.
- Mullins, C., Bonifacino, J. S. (2001). The molecular machinery for lysosome biogenesis. *Bioessays.* **23**, 333-343.
- Murakami, Y., Matsufuji, S., Kameji, T., Hayashi, S., Igarashi, K., Tamura, T., Tanaka, K., Ichihara, A. (1992). Ornithine decarboxylase is degraded by the 26S proteasome without ubiquitination. *Nature.* **360**, 597-599.

- Nakatsu, F., Sakuma, M., Matsuo, Y., Arase, H., Yamasaki, S., Nakamura, N., Saito, T., Ohno, H. (2000). A di-leucine signal in the ubiquitin moiety. Possible involvement in ubiquitination-mediated endocytosis. *J. Biol. Chem.* **275**, 26213-26219.
- Niedermann G. (2002). Immunological functions of the proteasome. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **268**, 91-136.
- Nijtmans, L. G., de Jong, L., Artal, S. M., Coates, P. J., Berden, J. A., Back, J. W., Muijsers, A. O., van der, S. H., Grivell, L. A. (2000). Prohibitins act as a membrane-bound chaperone for the stabilization of mitochondrial proteins. *EMBO J.* **19**, 2444-2451.
- Nikaido, T., Shimada, K., Shibata, M., Hata, M., Sakamoto, M., Takasaki, Y., Sato, C., Takahashi, T., Nishida, Y. (1990). Cloning and nucleotide sequence of cDNA for Ki antigen, a highly conserved nuclear protein detected with sera from patients with systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.* **79**, 209-214.
- Noda, T., Farquhar, M. G. (1992). A non-autophagic pathway for diversion of ER secretory proteins to lysosomes. *J. Cell Biol.* **119**, 85-97.
- Nuzum, C. T., Snodgrass, P. J. (1976). Multiple assays of the five urea-cycle enzymes in human liver homogenates. En: *The Urea Cycle* (Grisolía, S., Báguena, R., Mayor, F., eds.), pp 325-349, John Wiley and Sons Inc., New York.
- Oberdorf, J., Carlson, E. J., Skach, W. R. (2001). Redundancy of mammalian proteasome beta subunit function during endoplasmic reticulum associated degradation. *Biochemistry.* **40**, 13397-13405.
- Ohsumi, Y. (2001). Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 211-216.
- Oinonen, C., Rouvinen, J. (2000). Structural comparison of Ntn-hydrolases. *Protein Sci.* **9**, 2329-2337.
- Ono, Y., Sorimachi, H., Suzuki, K. (1998). Structure and physiology of calpain, an enigmatic protease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **245**, 289-294.
- Orci, L., Brown, M. S., Goldstein, J. L., García-Segura, L. M., Anderson, R. G. (1984). Increase in membrane cholesterol: a possible trigger for degradation of HMG CoA reductase and crystalloid endoplasmic reticulum in UT-1 cells. *Cell.* **36**, 835-845.
- Orlowski, M., Wilk, S. (1981). Purification and specificity of a membrane-bound metalloendopeptidase from bovine pituitaries. *Biochemistry.* **20**, 4942-4950.
- Ostrowska, H., Wojcik, C., Wilk, S., Omura, S., Kozlowski, L., Stoklosa, T., Worowski, K., Radziwon, P. (2000). Separation of cathepsin A-like enzyme and the proteasome: evidence that lactacystin/beta-lactone is not a specific inhibitor of the proteasome. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **32**, 747-757.

- Palmer, A., Rivett, A. J., Thomson, S., Hendil, K. B., Butcher, G. W., Fuertes, G., Knecht, E. (1996). Subpopulations of proteasomes in rat liver nuclei, microsomes and cytosol. *Biochem. J.* **316**, 401-407.
- Palombella, V. J., Rando, O. J., Goldberg, A. L., Maniatis, T. (1994). The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. *Cell.* **78**, 773-785.
- Peters, J. M., Franke, W. W., Kleinschmidt, J. A. (1994). Distinct 19S and 20S subcomplexes of the 26S proteasome and their distribution in the nucleus and the cytoplasm. *J. Biol. Chem.* **269**, 7709-7718.
- Petiot, A., Ogier-Denis, E., Blommaert, E. F., Meijer, A. J., Codogno, P. (2000). Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. *J. Biol. Chem.* **275**, 992-998.
- Pfeifer, U. (1987). Functional morphology of the lysosomal apparatus. En: *Lysosomes: Their Role in Protein Breakdown*. (Glaumann, H., Ballard, F. J., eds.), pp. 3-59, Academic Press, New York.
- Piccinini, M., Tazartes, O., Mezzatesta, C., Ricotti, E., Bedino, S., Grosso, F., Dianzani, U., Tovo, P. A., Mostert, M., Musso, A., Rinaudo, M. T. (2001). Proteasomes are a target of the anti-tumour drug vinblastine. *Biochem. J.* **356**, 835-841.
- Pisoni, R. L., Thoene, J. G. (1991). The transport systems of mammalian lysosomes. *Biochim. Biophys. Acta.* **1071**, 351-373.
- Pisoni, R. L., Velilla, V. Q. (1995). Evidence for an essential histidine residue located in the binding site of the cysteine-specific lysosomal transport protein. *Biochim. Biophys. Acta.* **1236**, 23-30.
- Pitas, R. E., Innerarity, T. L., Weinstein, J. N., Mahley, R. W. (1981). Acetoacetylated lipoproteins used to distinguish fibroblasts from macrophages in vitro by fluorescence microscopy. *Arteriosclerosis.* **1**, 177-185.
- Pösö, A. R., Wert, J. J. Jr., Mortimore, G. E. (1982). Multifunctional control of amino acids of deprivation-induced proteolysis in liver. Role of leucine. *J. Biol. Chem.* **257**, 12114-12120.
- Prince, A. M., May, J. S., Burton, G. R., Lyle, R. E., McGehee, R. E. Jr. (2002). Proteasomal degradation of retinoblastoma-related p130 during adipocyte differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **290**, 1066-1071.
- Puig, O. (1996). Bases moleculares de la Hipercolesterolemia Familiar en España. *Tesis Doctoral*. Universidad de Valencia.
- Rawlings, N. D., Barrett, A. J. (1993). Evolutionary families of peptidases. *Biochem. J.* **290**, 205-218.

- Realini, C., Dubiel, W., Pratt, G., Ferrell, K., Rechsteiner, M. (1994). Molecular cloning and expression of a gamma-interferon-inducible activator of the multicatalytic protease. *J. Biol. Chem.* **269**, 20727-20732.
- Reidlinger, J., Pike, A. M., Savory, P. J., Murray, R. Z., Rivett, A. J. (1997). Catalytic properties of 26S and 20S proteasomes and radiolabeling of MB1, LMP7, and C7 subunits associated with trypsin-like and chymotrypsin-like activities. *J. Biol. Chem.* **272**, 24899-24905.
- Reits, E. A., Vos, J. C., Gromme, M., Neefjes, J. (2000). The major substrates for TAP in vivo are derived from newly synthesized proteins. *Nature.* **404**, 774-778.
- Reynolds, E. S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* **17**, 208-212.
- Rivett, A. J. (1998). Intracellular distribution of proteasomes. *Curr. Opin. Immunol.* **10**, 110-114.
- Rivett, A. J., Knecht, E. (1993). Proteasome location. *Curr. Biol.* **3**, 127-129.
- Rivett, A. J., Palmer, A., Knecht, E. (1992). Electron microscopic localization of the multicatalytic proteinase complex in rat liver and in cultured cells. *J. Histochem. Cytochem.* **40**, 1165-1172.
- Rivett, A. J., Savory, P. J., Djaballah, H. (1994). Multicatalytic endopeptidase complex: proteasome. *Methods Enzymol.* **244**, 331-350.
- Rivett, A. J., Bose, S., Brooks, P., Broadfoot, K. I. (2001). Regulation of proteasome complexes by gamma-interferon and phosphorylation. *Biochimie.* **83**, 363-366.
- Robards, A. W., Wilson, A. J. (1993). Procedures in Electron Microscopy. John Wiley, Sons Ltd. University of York, U.K.
- Roberts, B. J. (1997). Evidence of proteasome-mediated cytochrome P-450 degradation. *J. Biol. Chem.* **272**, 9771-9778.
- Rock, K. L., Goldberg, A. L. (1999). Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu. Rev. Immunol.* **17**, 739-779.
- Rock, K. L., Gramm, C., Rothstein, L., Clark, K., Stein, R., Dick, L., Hwang, D., Goldberg, A. L. (1994). Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell.* **78**, 761-771.
- Rotin, D., Staub, O., Hagenauer-Tsapis, R. (2000). Ubiquitination and endocytosis of plasma membrane proteins: role of Nedd4/Rsp5p family of ubiquitin-protein ligases. *J. Membr. Biol.* **176**, 1-17.
- Rudenko, G., Henry, L., Henderson, K., Ichtchenko, K., Brown, M. S., Goldstein J. L., Deisenhofer, J. (2002). Structure of the LDL receptor extracellular domain at endosomal pH. *Science* **298**, 2337-2339.

- Russell, S. J., Steger, K. A., Johnston, S. A. (1999). Subcellular localization, stoichiometry, and protein levels of 26 S proteasome subunits in yeast. *J. Biol. Chem.* **274**, 21943-21952.
- Salvador, N., Aguado, C., Horst, M., Knecht, E. (2000). Import of a cytosolic protein into lysosomes by chaperone-mediated autophagy depends on its folding state. *J. Biol. Chem.* **275**, 27447-27456.
- Schnell-Landstrom, A. H., Andersson, A., Borg, L. A. (1991). Lysosomes and pancreatic islet function: adaptation of beta-cell lysosomes to various metabolic demands. *Metabolism.* **40**, 399-405.
- Schubert, U., Anton, L. C., Gibbs, J., Norbury, C. C., Yewdell, J. W., Bennink, J. R. (2000). Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature.* **404**, 770-774.
- Schwarze, P. E., Seglen, P. O. (1983). Paradoxical stimulation by amino acids of the degradation of [³⁵S]methionine-labelled, short-lived protein in isolated rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **117**, 509-516.
- Seglen, P. O. (1983). Inhibitors of lysosomal function. *Methods Enzymol.* **96**, 737-764.
- Seglen, P. O., Gordon, P. B. (1982). 3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79**, 1889-1892.
- Seglen, P. O., Gordon, P. B., Poli, A. (1980). Amino acid inhibition of the autophagic/lysosomal pathway of protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* **630**, 103-118.
- Seglen, P. O., Gordon, P. B., Tolleshaug, H., Hoyvik, H. (1986). Use of [3H]raffinose as a specific probe of autophagic sequestration. *Exp. Cell Res.* **162**, 273-277.
- Shepherd, J. C., Schumacher, T. N., Ashton-Rickardt, P. G., Imaeda, S., Ploegh, H. L., Janeway, C. A. Jr., Tonegawa, S. (1993). TAP1-dependent peptide translocation *in vitro* is ATP dependent and peptide selective. *Cell.* **74**, 577-584.
- Shimomura, I., Bashmakov, Y., Shimano, H., Horton, J. D., Goldstein, J. L., Brown, M. S. (1997). Cholesterol feeding reduces nuclear forms of sterol regulatory element binding proteins in hamster liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 12354-12359.
- Shite, S., Seguchi, T., Shimada, T., Ono, M., Kuwano, M. (1990). Rapid turnover of low-density lipoprotein receptor by a non-lysosomal pathway in mouse macrophage J774 cells and inhibitory effect of brefeldin A. *Eur. J. Biochem.* **191**, 491-497.
- Sijts, A. J., Ruppert, T., Rehmann, B., Schmidt, M., Koszinowski, U., Kloetzel, P. M. (2000). Efficient generation of a hepatitis B virus cytotoxic T lymphocyte epitope requires the structural features of immunoproteasomes. *J. Exp. Med.* **191**, 503-514.
- Slavotinek, A. M., Biesecker, L. G. (2001). Unfolding the role of chaperones and chaperonins in human disease. *Trends Genet.* **17**, 528-535.

- Smith, R. E., Farquhar, M. G. (1966). Lysosome function in the regulation of the secretory process in cells of the anterior pituitary gland. *J. Biol. Chem.* **31**, 319-347.
- Sommer, T., Wolf, D. H. (1997). Endoplasmic reticulum degradation: reverse protein flow of no return. *FASEB J.* **11**, 1227-1233.
- Sorimachi, H., Ishiura, S., Suzuki, K. (1997). Structure and physiological function of calpains. *Biochem. J.* **328**, 721-732.
- Soza, A., Knuehl, C., Groettrup, M., Henklein, P., Tanaka, K., Kloetzel, P. M. (1997). Expression and subcellular localization of mouse 20S proteasome activator complex PA28. *FEBS Lett.* **413**, 27-34.
- Sporn, M. B., Wanko, T., Dingman, W. (1962). The isolation of cell nuclei from rat brain. *J. Cell Biol.* **15**, 109-120.
- Staub, O., Abriel, H., Plant, P., Ishikawa, T., Kanelis, V., Saleki, R., Horisberger, J. D., Schild, L., Rotin, D. (2000). Regulation of the epithelial Na⁺ channel by Nedd4 and ubiquitination. *Kidney Int.* **57**, 809-815.
- Steglich, G., Neupert, W., Langer, T. (1999). Prohibitins regulate membrane protein degradation by the m-AAA protease in mitochondria. *Mol. Cell Biol.* **19**, 3435-3442.
- Stohwasser, R., Salzmann, U., Giesebrecht, J., Kloetzel, P. M., Holzhutter, H. G. (2000). Kinetic evidences for facilitation of peptide channelling by the proteasome activator PA28. *Eur. J. Biochem.* **267**, 6221-6230.
- Storrie, B., Madden, E. A. (1990). Isolation of subcellular organelles. *Methods Enzymol.* **182**, 203-225.
- Strickland, E., Hakala, K., Thomas, P. J., DeMartino, G. N. (2000). Recognition of misfolding proteins by PA700, the regulatory subcomplex of the 26S proteasome. *J. Biol. Chem.* **275**, 5565-5572.
- Suzuki, K., Sorimachi, H., Yoshizawa, T., Kinbara, K., Ishiura, S. (1995). Calpain: novel family members, activation, and physiologic function. *Biol. Chem. Hoppe Seyler.* **376**, 523-529.
- Suzuki, K., Kirisako, T., Kamada, Y., Mizushima, N., Noda, T., Ohsumi, Y. (2001). The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *EMBO J.* **20**, 5971-5981.
- Tanahashi, N., Yokota, K., Ahn, J. Y., Chung, C. H., Fujiwara, T., Takahashi, E., DeMartino, G. N., Slaughter, C. A., Toyonaga, T., Yamamura, K., Shimbara, N., Tanaka, K. (1997). Molecular properties of the proteasome activator PA28 family proteins and gamma-interferon regulation. *Genes Cells.* **2**, 195-211.
- Tompa, P., Mucsi, Z., Orosz, G., Friedrich, P. (2002). Calpastatin subdomains A and C are activators of calpain. *J. Biol. Chem.* **277**, 9022-9026.

- Tournu, C., Obled, A., Roux, M. P., Ferrara, M., Omura, S., Bechet, D. M. (2001). Glucose regulates protein catabolism in ras-transformed fibroblasts through a lysosomal-dependent proteolytic pathway. *Biochem. J.* **357**, 255-261.
- Truong-Tran, A. Q., Carter, J., Ruffin, R. E., Zalewski, P. D. (2001). The role of zinc in caspase activation and apoptotic cell death. *Biometals.* **14**, 315-330.
- Turner, G. C., Varshavsky, A. (2000). Detecting and measuring cotranslational protein degradation *in vivo*. *Science.* **289**, 2117-2120.
- Tuttle, D. L., Dunn, W. A. Jr. (1995). Divergent modes of autophagy in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *J. Cell Sci.* **108**, 25-35.
- Uchida, H., Shinoura, N., Kitayama, J., Watanabe, T., Nagawa, H., Hamada, H. (2002). Caspase-8 gene transduction augments radiation-induced apoptosis in DLD-1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **292**, 347-354.
- Vargas, J. L., Aniento, F., Cervera, J., Knecht, E. (1989). Vanadate inhibits degradation of short-lived, but not of long-lived, proteins in L-132 human cells. *Biochem. J.* **258**, 33-40.
- Vassault, A. (1983). Lactate dehydrogenase. En: *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H. U., ed.) 3rd ed., vol. 3, pp. 118-126, Verlag Chemie, Weinheim.
- Verma, R., McDonald, H., Yates, J. R., III, Deshaies, R. J. (2001). Selective degradation of ubiquitinated Sic1 by purified 26S proteasome yields active S phase cyclin-Cdk. *Mol. Cell.* **8**, 439-448.
- Walters, K. J., Kleijnen, M. F., Goh, A. M., Wagner, G., Howley, P. M. (2002). Structural studies of the interaction between ubiquitin family proteins and proteasome subunit S5a. *Biochemistry.* **41**, 1767-1777.
- Warburton, S., James, R. (1993). Hemocytometer cell counts and viability studies. En: *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (Doyle, A., Griffiths, J. B. y Newell, G., eds.), vol. 1, pp. 4B: 1.1-1.5. Wiley, Chichester.
- Weibel, E. R., Bolender, R. P. (1973). Stereological techniques for electron microscopic morphometry. En: *Principles and Techniques of Electron Microscopy*. (Hayat, M. A., ed.) vol. 3, pp. 237-296, van Nostrand Reinhold Co., New York.
- Wenzel, T., Baumeister, W. (1995). Conformational constraints in protein degradation by the 20S proteasome. *Nat. Struct. Biol.* **2**, 199-204.
- Wheatley, D. N., Giddings, M. R., Inglis, M. S. (1980). Kinetics of degradation of "short-" and "long-lived" proteins in cultured mammalian cells. *Cell Biol. Int. Rep.* **4**, 1081-1090.
- Wheatley, D. N., Grisolia, S., Hernández-Yago, J. (1982). Significance of the rapid degradation of newly synthesized proteins in mammalian cells: a working hypothesis. *J. Theor. Biol.* **98**, 283-300.

- Wickner, S., Maurizi, M. R., Gottesman, S. (1999). Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. *Science*. **286**, 1888-1893.
- Wilcox, D., Mason, R. W. (1992). Inhibition of cysteine proteinases in lysosomes and whole cells. *Biochem. J.* **285**, 495-502.
- Wilk, S., Orłowski, M. (1980). Cation-sensitive neutral endopeptidase: isolation and specificity of the bovine pituitary enzyme. *J. Neurochem.* **35**, 1172-1182.
- Wilk, S., Orłowski, M. (1983). Evidence that pituitary cation-sensitive neutral endopeptidase is a multicatalytic protease complex. *J. Neurochem.* **40**, 842-849.
- Wilkinson, C. R., Wallace, M., Morphew, M., Perry, P., Allshire, R., Javerzat, J. P., McIntosh, J. R. y Gordon, C. (1998). Localization of the 26S proteasome during mitosis and meiosis in fission yeast. *EMBO J.* **17**, 6465-6476.
- Wing, S. S., Haas, A. L., Goldberg, A. L. (1995). Increase in ubiquitin-protein conjugates concomitant with the increase in proteolysis in rat skeletal muscle during starvation and atrophy denervation. *Biochem. J.* **307**, 639-645.
- Witt, E., Zantopf, D., Schmidt, M., Kraft, R., Kloetzel, P. M., Kruger, E. (2000). Characterisation of the newly identified human Ump1 homologue POMP and analysis of LMP7(beta 5i) incorporation into 20 S proteasomes. *J. Mol. Biol.* **301**, 1-9.
- Wójcik, C., DeMartino, G.N. (2003). Intracellular localization of proteasomes. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **35**, 579-89.
- Wójcik, C., Tanaka, K., Paweletz, N., Naab, U., Wilk, S. (1998). Proteasome activator (PA28) subunits, alpha, beta and gamma (Ki antigen) in NT2 neuronal precursor cells and HeLa S3 cells. *Eur. J. Cell Biol.* **77**, 151-160.
- Yamamoto, T., Davis, C. G., Brown, M. S., Schneider, W. J., Casey, M. L., Goldstein, J. L., Russell, D. W. (1984). The human LDL receptor: a cysteine-rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA. *Cell*. **39**, 27-38.

ANEXO PUBLICACIONES

Subpopulations of proteasomes in rat liver nuclei, microsomes and cytosol

Amparo PALMER*, A. Jennifer RIVETT†, Stuart THOMSON†, Klavs B. HENDIL‡, Geoffrey W. BUTCHER§, Graciela FUERTES* and Erwin KNECHT*||

*Instituto de Investigaciones Citológicas, Amadeo de Saboya 4, 46010-Valencia, Spain, †Department of Biochemistry, University of Leicester, Leicester LE1 7RH, U.K., ‡August Krogh Institute, University of Copenhagen, Universitetsparken 13, DK 2100, Copenhagen O, Denmark, and §Department of Immunology, Babraham Institute, Babraham, Cambridgeshire CB2 4AT, U.K.

Mammalian proteasomes are composed of 14–17 different types of subunits, some of which, including major-histocompatibility-complex-encoded subunits LMP2 and LMP7, are non-essential and present in variable amounts. We have investigated the distribution of total proteasomes and some individual subunits in rat liver by quantitative immunoblot analysis of purified subcellular fractions (nuclei, mitochondria, microsomes and cytosol). Proteasomes were mainly found in the cytosol but were also present in the purified nuclear and microsomal fractions. In the nuclei, proteasomes were soluble or loosely attached to the chromatin, since they could be easily extracted by treatment with nucleases or high concentrations of salt. In the microsomes, proteasomes were on the outside of the membranes. Further subfractionation of the microsomes showed that the proteasomes

in this fraction were associated with the smooth endoplasmic reticulum and with the *cis*-Golgi but were practically absent from the rough endoplasmic reticulum. Using monospecific antibodies for some proteasomal subunits (C8, C9, LMP2 and Z), the composition of proteasomes in nuclei, microsomes and cytosol was investigated. Although there appear not to be differences in proteasome composition in the α subunits (C8 and C9) in the different locations, the relative amounts of some β subunits varied. Subunit Z was enriched in nuclear proteasomes but low in microsome-associated proteasomes, whereas LMP2, which was relatively low in nuclei, showed a small enrichment in the microsomes. These differences in subunit composition of proteasomes probably reflect differences in the function of proteasomes in distinct cell compartments.

INTRODUCTION

Proteasomes (multicatalytic proteinase complexes) are high-molecular-mass multisubunit complexes that form the major non-lysosomal degradative machinery of eukaryotic cells [1,2]. From the results of cell fractionation, immunohistochemical, immunofluorescence and immunogold electron microscopic studies (see [3,4] for references), it is clear that proteasomes can be found in both the nucleus and the cytoplasm of animal cells. Also, changes in their nuclear and cytoplasmic distribution have been reported during development, following cell transformation and at different stages of the cell cycle [5–9], and a mechanism for their translocation across the nuclear membrane must exist. In addition, it seems possible that there may be differences in proteasomes localized in the nucleus and the cytoplasm. Preliminary studies with proteasomes isolated from nuclei and cytoplasm showed no obvious differences [10], but variations in proteasome structures have since become apparent.

The proteasome particle has four stacked rings, each comprising seven subunits, and the rings at both ends are formed by α subunits and the two central rings by β subunits. Yeast proteasomes are made up of two of each of 14 different subunits [11]. However, in animal cells, in addition to the 14 subunits that are homologues of the yeast proteasome subunits, genes for three other non-essential β proteasome subunits have been found. Two of these subunits, LMP2 and LMP7, are γ -interferon inducible and are encoded within the major histocompatibility complex (MHC) class II region. LMP2 and LMP7 are closely related to subunits δ and MB1 respectively, and there is now evidence from the work of several different groups (e.g. [12–14]) to show that the MHC-encoded subunits can replace δ and MB1 in some proteasomes and also modulate the proteolytic activities

(reviewed in [15]). There is some evidence to suggest that LMP2 and LMP7 may enhance the efficiency of presentation of viral (and other) antigens by the MHC class I pathway [16–18]. Another variable subunit, MECL1, is also induced by γ -interferon [19] and is closely related to subunit Z [20]. The presence of LMP2, LMP7 and MECL1 subunits in many cells and tissues must give rise to subpopulations of proteasomes. However, it is not clear whether the proteasomes found in different subcellular localizations are identical or whether their characteristics vary to accomplish the different functions. We have demonstrated previously, using immunogold procedures, that proteasomes are present in the nucleus and in the cytoplasm, and that some proteasomes appear to be closely associated with the endoplasmic reticulum [21]. In this study we have investigated further aspects of the localization of proteasomes in the nucleus and associated with the endoplasmic reticulum, and also demonstrated, by immunoblot analysis of well-characterized subcellular fractions isolated from rat liver, some differences in the subunit composition of proteasomes in different locations.

MATERIALS AND METHODS

Materials

The materials and their sources were as described previously [9,21,22] with the following additions: trypsin (bovine pancreas), soybean trypsin inhibitor, 3,3'-diaminobenzidine, 4',6'-diamidino-2-phenylindol dihydrochloride, Butvar B-98, poly-L-lysine hydrobromide (70 000–150 000 Da), DNase I and RNase A (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.); dithiothreitol (Boehringer, Mannheim, Germany); enhanced chemiluminescence Western blotting kit (Amersham, Amersham, Bucks, U.K.); Paraplast (Manoject Scientific, Kildare, Ireland); Vectastain kit (Vector

Abbreviations used: MHC, major histocompatibility complex; DNP, dinitrophenol.

|| To whom correspondence should be addressed.

Labs., Burlingame, CA, U.S.A.); Bacto Fa-mounting fluid (Difco, Detroit, MI, U.S.A.); hydrogen peroxide (Merck, Darmstadt, Germany); xylene (Panreac, Montcada i Reixac, Spain); sodium pentobarbital (Abbot Labs., Madrid, Spain). All other reagents were of the best analytical quality available.

Proteasomes and antibodies

Proteasomes were prepared from rat liver, and anti-proteasome antibodies (anti-DNP-MCP) were prepared in rabbits, using dinitrophenol (DNP)-modified proteasomes as described previously [23]. Purified IgGs were obtained using Protein A-agarose. The specificity of the antibodies in rat liver was checked as described previously [21,23]. Control IgG preparations for immunolabelling experiments were obtained by removing anti-proteasome IgG with purified rat liver proteasomes bound to cyanogen bromide-activated Sepharose 4B [9] or by preparing IgG fractions from preimmune serum. Proteasome-subunit-specific monoclonal antibodies (MCP72 for C8, MCP257 for C9 and MCP165 for Z) were those raised against human proteasomes [20]. Antibody to MB1 was produced in rabbits immunized with the peptide DNVADLHEKYSGSTC, coupled to a purified protein derivative of tuberculin as described previously [24]. Anti-LMP2 antibodies were raised in a mouse and a rabbit by immunization with rat LMP2 protein that was produced in *Escherichia coli* using the Qiaexpress system (QIAGEN, Chatsworth, CA, U.S.A.), and anti-LMP7 antibodies were raised against the recombinant protein in a rabbit. Rat LMP2 and LMP7 cDNAs were derived from a DA rat lymphoblast library (E. Deverson, I. Milisav, J. Coadwell, J. C. Howard and G. W. Butcher, unpublished work). Anti-(carbamoyl phosphate synthetase) monoclonal antibodies were generously provided by Dr. J. Cervera (Instituto de Investigaciones Citológicas, Valencia, Spain). Polyclonal antibodies against recombinant subunits were affinity purified against the purified protein.

Isolation of rat liver fractions

Fed or 20-h-fasted male Wistar rats (Interfauna Ibérica, Sant Feliu de Codines, Spain) weighing 200–250 g were used throughout. Purified nuclear fractions were obtained as described previously [25]. Microsomal and cytosolic fractions were the sediment and supernatant, respectively, from the last of three successive centrifugations at 4 °C (600 g, 10 min; 17000 g, 10 min; and 150000 g, 60 min). Microsomes were washed once by resuspending the sediment in 10 vol. of 0.25 M sucrose. Mitochondria were prepared as described previously [26].

All further washings (up to five) of nuclear and microsomal pellets were carried out by resuspending them in 10 vol. of 0.25 M sucrose. For the trypsin treatment of microsomes, 100 µg of microsomes were incubated for 1 h at 37 °C with increasing amounts of trypsin as indicated in the corresponding Figure, followed by the addition of twice as much soybean trypsin inhibitor. After the incubation, the samples were boiled for 3 min in SDS/PAGE sample buffer containing 2 mM PMSF.

A nuclear-matrix fraction was obtained from the purified nuclei following two different procedures [27,28]. To separate plasma membrane, rough and smooth endoplasmic reticulum and Golgi complex, the method described by Fleischer and Kervina [29] was followed. In addition, rough and smooth endoplasmic reticulum were prepared by the method described by Graham [30] and Golgi complexes and their *cis*- and *trans*-Golgi fractions were purified by the method of Bretz et al. [31]. The purity of the fractions was judged by standard enzymic measurements and/or electron microscopy as reported previously [22,32].

Immunoblotting

Rat liver fractions and proteasomes were subjected to SDS/PAGE (15% acrylamide) in slab gels [33] followed by electrophoretic blotting to nitrocellulose membranes using either a blotting tank or a semi-dry transfer cell (Bio-Rad, Richmond, CA, U.S.A.). The blots were stained for 2 min with Ponceau S solution [0.2% (w/v) in 3% (w/v) trichloroacetic acid], destained with PBS and reacted for 16 h at 4 °C with the various anti-proteasome antibodies and then for 1 h at 20 °C with goat anti-rabbit or anti-mouse IgG-alkaline phosphatase conjugates. The enzyme was suitably developed with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate and Nitro Blue Tetrazolium by standard procedures. Densitometric analysis of the Western blots was carried out in a 2202 Ultrascan laser densitometer from Pharmacia LKB (Uppsala, Sweden) with a Hewlett Packard (Palo Alto, CA, U.S.A.) 3396 Series II integrator. The linearity of the method was established using proteasomes purified from rat liver as a standard in the blotting assay.

Electron microscopy, immunocytological and immunohistological procedures

Rat liver portions (approximately 1 mm³) and cellular fractions were fixed and embedded, either in Vestopal W (for conventional electron microscopy) or in Lowicryl K4M (for immunogold procedures), by standard procedures [21,32]. The immunogold procedures and the calculation of labelling density (number of gold particles/µm² of cell compartment area) were carried out as described previously [21].

For the immunoperoxidase detection of proteasomes, rats were anaesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg of body weight) and perfused transcatheterially, via a peristaltic pump set to deliver 12 ml/min. Brief perfusion of cold saline to rinse the vascular tree was followed by 0.5 ml/g of body weight of cold 30% sucrose in PBS. The liver was fixed by immersion in 4% paraformaldehyde/0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, for 4 h at 4 °C, washed overnight in PBS and embedded in paraffin (Paraplast) by standard procedures. Sections (7 µm thick) were mounted on microscope slides coated with poly-L-lysine, deparaffined, and bathed for 1 h at room temperature in 1% H₂O₂ in 50 mM Tris/HCl (pH 7.6)/0.9% NaCl to inhibit endogenous peroxidase activity. After an overnight incubation in the various antibodies, the sections were stained using the Vectastain kit, based on the avidin-biotin-peroxidase complex method and following the manufacturer's instructions. The resulting label was detected by using 3,3'-diaminobenzidine as a chromogen.

For immunofluorescence, isolated nuclei from rat liver were dried on Butvar B-98-coated slides and fixed for 5 min with absolute methanol at -20 °C. Incubation with anti-DNP-MCP was for 12 h and, after washing with PBS containing 500 mM NaCl and 0.5% Tween 20, the slides were incubated with goat anti-rabbit IgG-fluorescein isothiocyanate-conjugated F(ab')₂ fragment for 1 h at room temperature. Slides were washed with PBS containing 500 mM NaCl and 0.5% Tween 20 and mounted in Bacto Fa-mounting fluid, pH 7.2. In all the preparations DNA was stained with 1 µg/ml 4',6-diamidino-2-phenylindol dihydrochloride in PBS.

RESULTS

Immunoblot localization of proteasomes in rat liver fractions with polyclonal anti-proteasome antibodies raised against the whole 20 S proteasome

When four different rat liver fractions (nuclei, mitochondria, microsomes and cytosol) were tested by Western-blot analysis

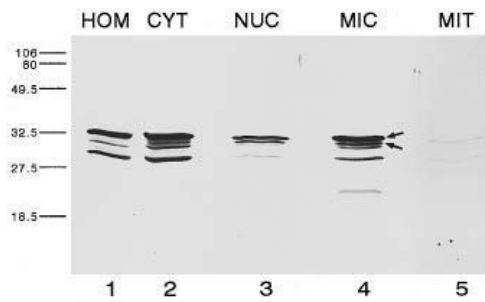


Figure 1 Immunolocalization of proteasomes in rat liver fractions

Proteins from the various fractions (25 μ g for homogenate and cytosol and 100 μ g for nuclei, microsomes and mitochondria) were separated by SDS/PAGE and immunoblotted with polyclonal anti-DNP-MCP antibodies. The two bands used for the densitometric analysis (the same for all fractions) are marked by arrows in lane 4. HOM, homogenate; CYT, cytosol; NUC, nuclei; MIC, microsomes; and MIT, mitochondria. The positions of molecular-mass markers and their size in kDa are indicated on the left.

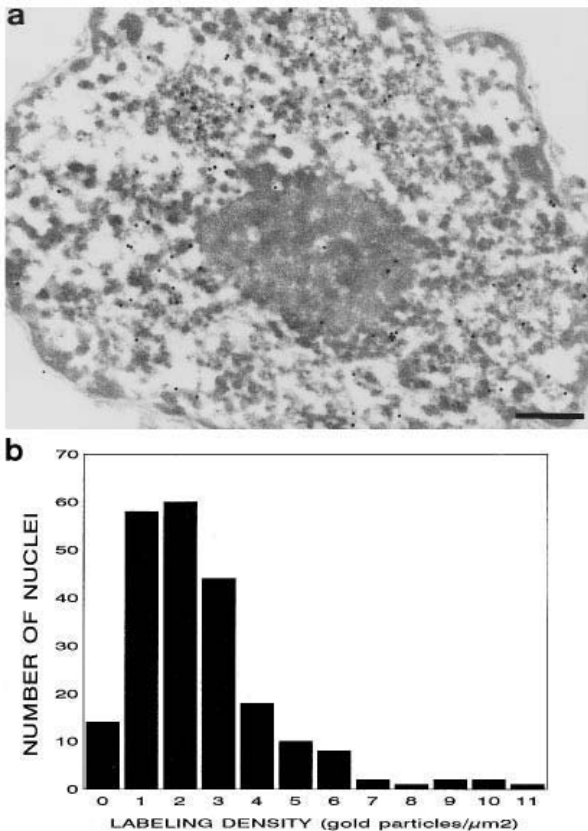


Figure 2 Localization of proteasomes in isolated nuclei

(a) Electron microscopic immunogold localization of proteasomes using polyclonal anti-DNP-MCP antibodies. The distribution of proteasomes shown in this representative nucleus was similar to that found in the nuclei from intact rat liver tissue. The labelling densities in the experiments with these preparations were 2.7 (anti-DNP-MCP labelling) and 0.7 (control labelling) gold particles/ μ m². The bar is 0.5 μ m long. (b) Frequency histogram of immunogold labelling densities, using anti-DNP-MCP antibodies, in individual nuclei from several isolation experiments.

with a polyclonal anti-(20 S proteasome) antibody (anti-DNP-MCP), proteasomes were found clearly associated with cytosol, nuclei and microsomes (Figure 1). By being careful to make them

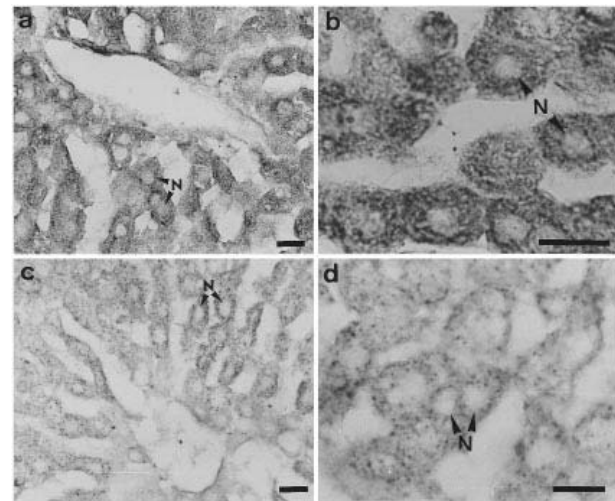


Figure 3 Localization by immunoperoxidase of proteasomes in rat liver

Immunoperoxidase with rat liver using anti-DNP-MCP antibodies (a,b) or, as a control of the procedure, an antibody against the mitochondrial enzyme carbamoyl phosphate synthetase (c,d). No immunoreaction was observed in incubations carried out with control IgG preparations (see the Materials and methods section). Some nuclei (N) are indicated by arrows. The bars represent 50 μ m.

quantitative, densitometric analyses of the Western blots from four independent cell-fractionation experiments showed that, for the same amount of bulk protein in each fraction, the level of proteasomes in the cytosol is 10-fold higher than in the nuclei and 6–7-fold higher than in the microsomal fraction. The results were essentially similar with fed and starved rats, except that in the latter a small quantity of proteasomes was sometimes found associated with the mitochondrial fraction. This immunoreactivity may be due to the proteasomes that, under starvation conditions, are incorporated for degradation into the lysosomes [22]. Similar qualitative and quantitative results were obtained using a second polyclonal anti-(20 S proteasome) serum. In some experiments, in addition to the proteasomal bands, a lower-molecular-mass band was sometimes evident in the microsomal fraction. Since this band only appeared in some preparations its nature was not further investigated.

We investigated whether the low quantity of proteasomes found in the nuclei could be due to their release during the homogenization, subfractionation and/or extensive washing procedures. This is unlikely, since we calculated, by immunogold quantification of the proteasome labelling in the nuclei from the various purification steps, that the losses represent, at most, 20–25% of the proteasomes originally present in the nuclei from rat liver. The immunogold localization of the proteasomes in the isolated nuclei was similar to that already reported in the rat hepatocytes [21]: i.e. inside and mostly at the periphery of heterochromatin and of nucleolar areas (Figure 2a). The distribution of individual nuclei according to their number of gold particles/ μ m² corresponds to a normal distribution (Figure 2b). This indicates that different nuclei contain a similar quantity of proteasomes.

Immunofluorescence studies of the isolated nuclei (results not shown) and immunoperoxidase staining of intact liver (Figure 3) with anti-DNP-MCP confirm the presence of proteasomes in the liver nuclei, although in much lower amounts than in the cytosol. Further washings (up to five) of the purified nuclear fraction did not decrease the quantity of proteasomes associated with these

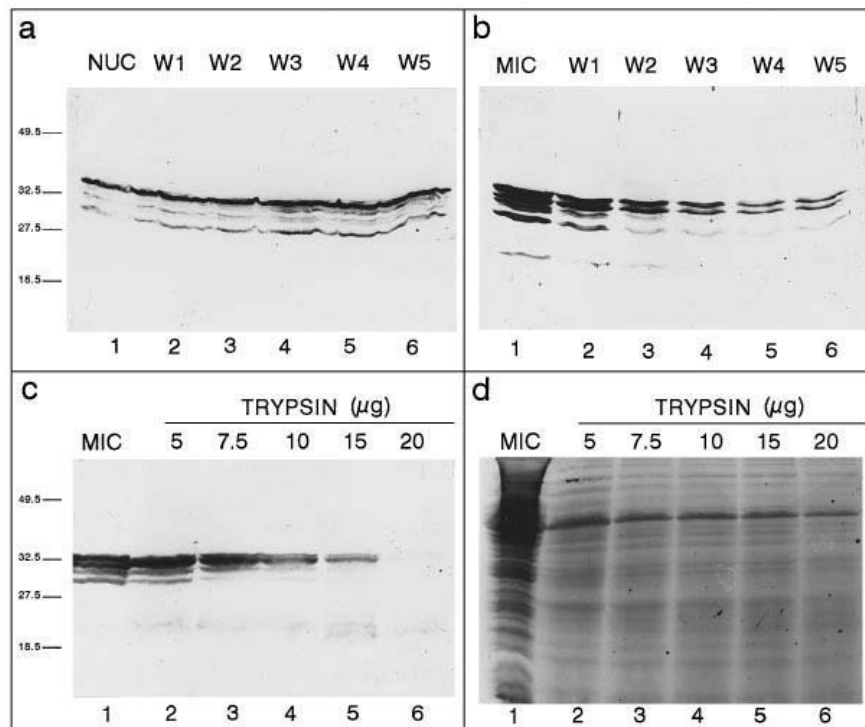


Figure 4 Association of proteasomes with the nuclei (NUC) and with the microsomes (MIC)

(a,b) Effect of five different sequential washes (W1–W5) on the association of proteasomes with the purified nuclei and microsomes respectively. Proteins (100 μ g) from the various fractions were separated by SDS/PAGE and immunoblotted with anti-DNP-MCP antibodies. (c,d) Effect of various trypsin treatments on the association of proteasomes with microsomes. Microsomes (100 μ g) were incubated for 1 h at 37 °C with the indicated amounts of trypsin followed by the addition of twice as much soybean trypsin inhibitor. After incubation, the samples were boiled for 3 min in SDS/PAGE sample buffer containing 2 mM PMSF, subjected to SDS/PAGE and either immunoblotted with anti-DNP-MCP antibodies (c) or stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 (d). The positions of molecular-mass markers and their size in kDa are indicated on the left.

fractions, as shown by immunogold procedures (results not shown) and immunoblot analysis (Figure 4a). In contrast, the proteasomes associated with the microsomal fraction were progressively washed out (Figure 4b). However, on the basis of the washing volume used, the observed decrease in the quantity of proteasomes associated with the microsomes with progressive washing is much lower than expected if this association were merely due to proteasomal contamination of these fractions. Also, the microsome-associated proteasomes were progressively eliminated by a trypsin treatment (Figure 4c), which does not greatly affect the microsomal pattern of bands in SDS/PAGE (Figure 4d). We conclude, therefore, that the proteasomes associated with the microsomal fraction are on the outside of these preparations, probably loosely attached to the microsomal membrane.

Further insights into the nuclear and endoplasmic reticulum localization of the proteasomes

To gain more insights into the nuclear and endoplasmic reticulum localization of the proteasomes we further subfractionated these two preparations. Figure 5 shows the electron microscopic appearance of some of the fractions used in our experiments to illustrate their purity.

The nucleus of eukaryotic cells contains a nuclear matrix, which is operationally defined as the non-chromatin nuclear proteins that remain after treatment with nucleases, chaotropic agents and high concentrations of salt. Figures 6(a) and 6(b) show immunoblots of various nuclear subfractions obtained by

the successive treatment of the isolated nuclei by two different procedures with nucleases, elevated salt concentrations and non-ionic detergents. In both cases, most of the nuclear-associated proteasomes are removed by the above-mentioned treatments (which extract the chromatin and the soluble and associated non-histone proteins and histones). The microsomal fraction mainly contains rough and smooth endoplasmic reticulum, components of the Golgi complex and plasma membrane. No proteasomes were found associated with purified fractions enriched in plasma membrane (results not shown) or rough endoplasmic reticulum (Figures 6c and 6d). In contrast, we found, using monoclonal and polyclonal antibodies, that most of the proteasome labelling was associated with the microsomal fraction enriched in smooth endoplasmic reticulum (Figures 6c and 6d) and in Golgi components. When the Golgi complex was further fractionated, it was found that the labelling was mainly associated with the fraction enriched in the *cis* part of the Golgi complex (Figures 6e and 6f). Immunogold analysis of the isolated fractions confirmed that the labelling associated with microsomes is found in the fractions devoid of rough endoplasmic reticulum (results not shown).

Analysis of variable subunit composition of proteasomes in rat liver nuclei, microsomes and cytosol

Using specific antibodies for two α subunits (C8 and C9), and comparing the results obtained with the polyclonal antibodies raised against the whole 20 S proteasome (anti-DNP-MCP), we were unable to find differences in the distribution of the labelling

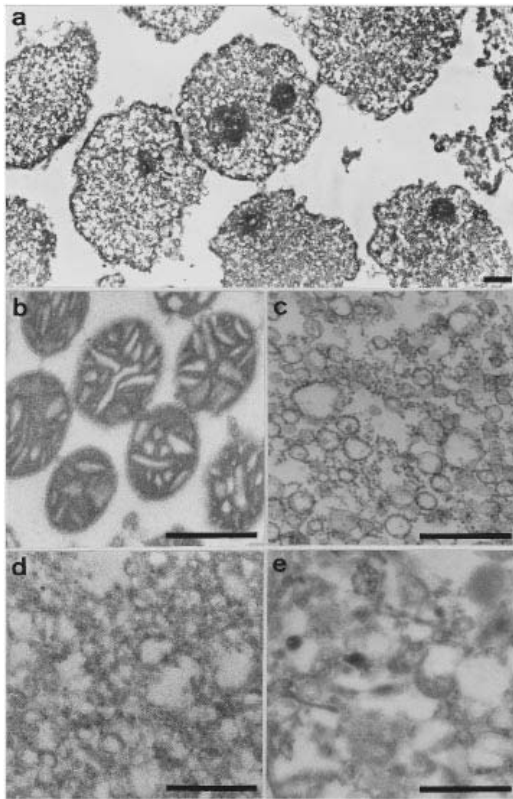


Figure 5 Electron microscopic morphological appearance of various rat liver subcellular fractions used in these studies

Nuclei (a); mitochondria (b); rough endoplasmic reticulum (c); smooth endoplasmic reticulum (d); Golgi complex (e). Bars: 1 μm (a) and 0.5 μm (b–e).

between the nuclear, microsomal and cytosolic preparations (see, e.g., Figure 1, Figures 7a and 7b and Table 1). However, the distribution of the β subunits LMP2 and, especially, Z (compare Figures 7c and 7d and Table 1) was different: LMP2 was slightly enriched in the microsomes and at relatively lower amounts than the α subunits in the nucleus whereas Z was almost absent from microsomes and enriched 3–4-fold in the nuclei when compared with the α subunits. Although we also found that two β subunits (LMP7 and MB1) were apparently either present at very low amounts or absent from the microsomes and nuclei (results not shown), the expected intensity of the bands in the nuclei and microsomes, on the basis of the results with the homogenate and cytosol, was outside the linearity of the blotting assay, as estimated using purified rat liver proteasomes as a standard. Attempts to increase the sensitivity of the assay (either using higher amounts of protein of the fractions or the enhanced chemiluminescence assay) were unsuccessful. Therefore, we can only conclude that in rat liver the proteasomes localized in different cell compartments appear to differ in their content in, at least, two β subunits (LMP2 and especially Z).

DISCUSSION

The results reported here provide further evidence for the presence of proteasomes in the nucleus, in the cytoplasm and associated with the endoplasmic reticulum (microsomes). Sub-fractionation of the nuclei showed that most of the proteasomes

are easily detached from the nucleus by treatment with high salt or nucleases, showing that in rat liver most nuclear proteasomes are not associated with the nuclear matrix. In contrast, it has been recently reported [34] that proteasomes are associated with the nuclear scaffold of a simian virus 40-immortalized, Ras-transformed rat hepatocyte cell line. The proteins of the nuclear scaffold change with the differentiation stage of the cell and are believed to play a fundamental role in growth-related functions of the cell nucleus, including regulation of gene expression. The apparent difference between our results may therefore be explained by the fact that the transformed cells are actively dividing.

The localization of proteasomes to the cytoplasmic surface of the microsomes (which form outside-out from the endoplasmic reticulum and associated organelles) and not to the lumen of these structures is relevant to the poorly understood process of protein degradation in the endoplasmic reticulum [35]. Several recent reports have implicated proteasomes in the degradation of endoplasmic reticulum proteins [36,37], although proteasomes are clearly not involved in all the protein degradation associated with this compartment [38]. It appears from the localization of proteasomes outside the lumen of the endoplasmic reticulum that, if proteasomes participate in this degradation, either the proteins should be transported outside the endoplasmic reticulum, or degradation should start with the cytosol-exposed part of these proteins. Interestingly one of the ubiquitin-conjugating enzymes is located in the membrane of the endoplasmic reticulum with its catalytic domain facing the cytosol [39].

The association of proteasomes with the smooth endoplasmic reticulum and *cis*-Golgi fractions reported here is also consistent with their possible role in the degradation of cytoplasmic proteins for antigen presentation. Since in hepatocytes the Golgi complex is scarce (less than 1% of the cell volume; see, e.g., [21]) the association of proteasomes may be due to co-purification of the smooth endoplasmic reticulum physically associated with the *cis*-Golgi or transitional endoplasmic reticulum (a series of smooth membrane limited cisternae and vesicles from the endoplasmic reticulum, some of which may also form part of the *cis*-Golgi network). In fact, another component of the antigen-presentation machinery (TAP1/TAP2 heterodimer, a transporter molecule associated with antigen processing that is responsible for the ATP-dependent transmembrane translocation of selected peptides from the cytosol to the site of MHC class I assembly) [40] have been also found, by immunogold electron microscopy of cryosections, to be located at the endoplasmic reticulum and *cis*-Golgi [41].

As might be expected from current knowledge about the structure of animal cell proteasomes [1,2], our results suggest that there are not significant differences in the composition of α -type subunits in proteasomes from different locations. However, the two β subunits for which we had suitable antibodies showed differences in their relative distribution. Observations that the β -subunit composition of proteasomes affects their activities (reviewed in [15]) must have implications for their functions. LMP2 is only present in low levels in liver proteasomes [42], but our finding of a slight enrichment of this MHC-encoded subunit in microsome-associated proteasomes (Figure 7) suggests that LMP2-containing proteasomes that are involved in antigen processing [17,18] can be localized at the surface of the smooth endoplasmic reticulum, where TAP transporters can translocate peptides across the membrane for association with MHC class I molecules [43]. However, LMP2 is also found in nuclear and cytoplasmic proteasomes in thymus [44] as well as in liver.

The relative enrichment of the variable β subunit Z compared with proteasome α subunits in the nuclei is very striking. The

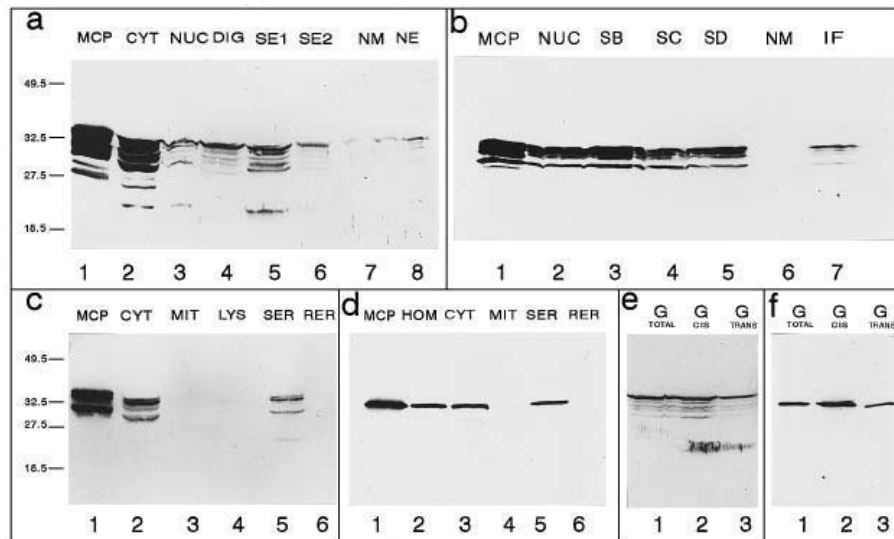


Figure 6 Immunolocalization of proteasomes in several subfractions prepared from rat liver nuclei and microsomes

Proteins (50 μ g) from the various fractions were separated by SDS/PAGE and immunoblotted with polyclonal anti-DNP-MCP antibodies (**a,b,c,e**) or with a monoclonal antibody, MCP257, for an α -type proteasomal subunit (**d,f**). (**a**) Lane 1, proteasomes (1 μ g; MCP); lane 2, cytosol (CYT); lane 3, nuclear fraction (NUC); lanes 4–6, proteins released from nuclei by nucleases (DIG) or high salt (SE1, SE2) treatments; lane 7, nuclear matrix (NM); lane 8, nuclear envelope (NE). (**b**) Lane 1, proteasomes (1 μ g; MCP); lane 2, nuclear fraction (NUC); lanes 3–5, proteins released from the nuclei by Triton X-100 (SB), high salt (SC) or nuclease (SD) treatments; lane 6, nuclear matrix (NM); lane 7, intermediate filaments (IF). (**c**) Lane 1, proteasomes (1 μ g; MCP); lane 2, cytosol (CYT); lane 3, mitochondria (MIT); lane 4, lysosomes (LYS); lane 5, smooth endoplasmic reticulum (SER); lane 6, rough endoplasmic reticulum (RER). (**d**) As (**c**) except with antibody MCP257 and including homogenate (HOM) instead of lysosomes in lane 2. (**e,f**) Fractions enriched for Golgi (G_{TOTAL}); *cis*-Golgi (G_{CIS}); or *trans*-Golgi (G_{TRANS}). The positions of molecular-mass markers and their size in kDa are indicated on the left.

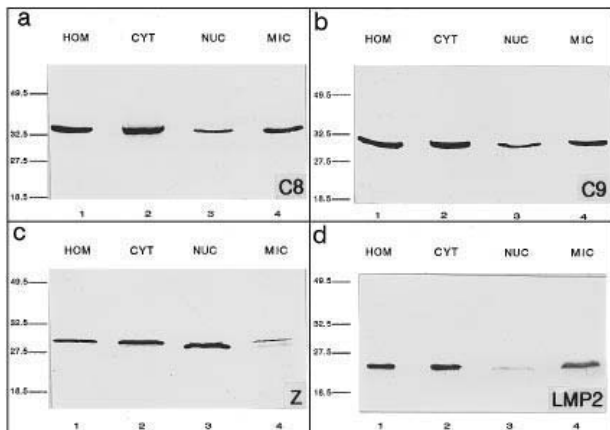


Figure 7 Immunolocalization of α and β proteasomal subunits in rat liver fractions

Proteins from the various fractions (25 μ g for homogenate and cytosol and 100 μ g for nuclei and microsomes) were separated by SDS/PAGE and immunoblotted with two different monoclonal antibodies for α subunits [MCP72 for C8 (**a**) and MCP257 for C9 (**b**)] or with antibodies for β subunits [mouse polyclonal for LMP2 (**c**) and MCP165 for Z (**d**)]. Abbreviations: HOM, homogenate; CYT, cytosol; NUC, nuclei; and MIC, microsomes. The positions of molecular-mass markers and their size in kDa are indicated on the left.

amount of Z in nuclei is 13-fold that found in the microsomes, whereas the amount of LMP2 in the nuclei is only about one-sixth of that found associated with the microsomes. These results demonstrate that different subpopulations of proteasomes do indeed have different subcellular locations. Although it would

Table 1 Subcellular distribution of the proteasomes and some of its various subunits

Immunoblots, derived from the number of independent cell fractionation experiments indicated in parentheses after the antibody employed, were prepared as described in the Materials and methods section. They were suitably developed and densitometrically analysed. The data were calculated for the same amount of bulk protein in each fraction and are presented as a percentage \pm S.D. of the total absorbance (sum of absorbances of the cytosol, nuclear and microsomal fractions) in one fraction. *, **, *** Differences from anti-DNP-MCP significant at $P < 0.05$, 0.025 and 0.0005 respectively.

Antibody	Subunit	Cytosol	Nuclei	Microsomes
Anti-DNP-MCP (4)	Several	83.2 \pm 3.4	5.4 \pm 1.6	11.3 \pm 2.0
MCP72 (8)	C8	83.1 \pm 3.0	5.1 \pm 2.1	11.8 \pm 1.4
MCP257 (4)	C9	83.9 \pm 2.8	5.3 \pm 1.6	10.7 \pm 1.2
Anti-LMP2 (5)	LMP2	83.8 \pm 3.5	2.2 \pm 1.8**	14.0 \pm 1.9*
MCP165 (6)	Z	80.4 \pm 5.3	18.2 \pm 4.0***	1.4 \pm 0.9***

clearly be of interest to investigate the localization of the other variable β subunits, we do not at present have suitable antibodies. More detailed studies would be required to determine possible variations in subunit composition of proteasomes in different cells, in the various locations and in different situations.

We thank Dr. Fernando Martínez-García and Cristian Font from University of Valencia for their help with immunohistochemical studies and A. Montaner for technical assistance. The work was supported in part by Dirección General de Investigación Científica y Técnica del Ministerio de Educación y Ciencia (PB94-1281), Fondo de Investigación Sanitaria de la Seguridad Social (93/0408) and by grants from the Ministerio de Educación y Ciencia (SAB94-0030) and the Biotechnology and Biological Sciences Research Council. A. P. is a fellow from Ministerio de Educación y Ciencia, and A. J. R. is a Lister Institute–Jenner Research Fellow.

REFERENCES

- 1 Rubin, D. M. and Finley, D. (1995) *Curr. Biol.* **5**, 854–858
- 2 Jentsch, S. and Schlenker, S. (1995) *Cell* **82**, 881–884
- 3 Tanaka, K., Yoshimura, T., Tamura, T., Fujiwara, T., Kumatori, A. and Ichihara, A. (1990) *FEBS Lett.* **271**, 41–46
- 4 Rivett, A. J. and Knecht, E. (1993) *Curr. Biol.* **3**, 127–129
- 5 Klein, U., Gernold, M. and Kloetzel, P. M. (1990) *J. Cell Biol.* **111**, 2275–2282
- 6 Kanayama, H., Tanaka, K., Aki, M., Kagawa, S., Miyaji, H., Satoh, M., Okada, F., Sato, S., Shimbara, N. and Ichihara, A. (1991) *Cancer Res.* **51**, 6677–6685
- 7 Kawahara, H. and Yokosawa, H. (1992) *Devel. Biol.* **151**, 27–33
- 8 Amsterdam, A., Pitzer, F. and Baumeister, W. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 99–103
- 9 Palmer, A., Mason, G. G. F., Paramio, J. M., Knecht, E. and Rivett, A. J. (1994) *Eur. J. Cell Biol.* **64**, 163–175
- 10 Tanaka, K., Kumatori, A., Ii, K. and Ichihara, A. (1989) *J. Cell. Physiol.* **139**, 34–41
- 11 Heinemeyer, W., Tröndle, N., Albrecht, G. and Wolf, D. H. (1994) *Biochemistry* **33**, 12229–12237
- 12 Belich, M. P., Glynn, R. J., Senger, G., Sheer, D. and Trowsdale, J. (1994) *Curr. Biol.* **4**, 769–776
- 13 Fröh, K., Gossen, M., Wang, K., Bujard, H., Petersen, P. A. and Yang, Y. (1994) *EMBO J.* **13**, 3236–3244
- 14 Akiyama, K., Kagawa, S., Tamura, T., Shimbara, N., Takashina, M., Kristensen, P., Hendil, K. B., Tanaka, K. and Ichihara, A. (1994) *FEBS Lett.* **343**, 85–88
- 15 Mason, G. G. F. and Rivett, A. J. (1994) *Chem. Biol.* **1**, 197–199
- 16 Fehling, H. J., Swat, W., Laplace, C., Kühn, R., Rajewsky, K., Müller, U. and von Boehmer, H. (1994) *Science* **265**, 1234–1237
- 17 van Kaer, L., Ashton-Rickardt, P. G., Eichelberger, M., Gaczynska, M., Nagashima, K., Rock, K. L., Goldberg, A. L., Doherty, P. C. and Tonegawa, S. (1994) *Immunity* **1**, 533–541
- 18 Sibille, C., Gould, K. G., Willard-Gallo, K., Thomson, S., Rivett, A. J., Powis, S., Butcher, G. W. and De Baetselier, P. (1995) *Curr. Biol.* **5**, 923–930
- 19 Larsen, F., Solheim, J., Kristensen, T., Kolstow, A. B. and Prydz, H. (1993) *Human Mol. Genet.* **2**, 1589–1595
- 20 Kristensen, P., Johnsen, A. H., Uerkvitz, W., Tanaka, K. and Hendil, K. B. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **205**, 1785–1789
- 21 Rivett, A. J., Palmer, A. and Knecht, E. (1992) *J. Histochem. Cytochem.* **40**, 1165–1172
- 22 Cuervo, A. M., Palmer, A., Rivett, A. J. and Knecht, E. (1995) *Eur. J. Biochem.* **227**, 792–800
- 23 Rivett, A. J. and Sweeney, S. T. (1991) *Biochem. J.* **278**, 171–177
- 24 Lachmann, P. J., Strangeways, L., Vyakarnam, A. and Evan, G. (1986) *Ciba Found. Symp.* **119**, 25–57
- 25 Wang, T. Y. (1967) *Methods Enzymol.* **12**, 417–421
- 26 Morimoto, T., Matsuura, S. and Arpin, M. (1983) *Methods Enzymol.* **97**, 408–426
- 27 Kaufmann, S. C. and Shaper, J. H. (1984) *Exp. Cell Res.* **155**, 477–495
- 28 Tawfic, S. and Ahmed, K. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 7489–7493
- 29 Fleischer, S. and Kervina, M. (1974) *Methods Enzymol.* **31**, 6–41
- 30 Graham, J. (1989) in *Centrifugation: A Practical Approach* (Rickwood, D. and Hames, B. D., eds.), 2nd edn., pp. 161–182, IRL Press, Oxford
- 31 Bretz, R., Bretz, H. and Palade, G. E. (1980) *J. Cell Biol.* **84**, 87–101
- 32 Aniento, F., Roche, E., Cuervo, A. M. and Knecht, E. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 10463–10470
- 33 Laemmli, U. K. (1970) *Nature (London)* **227**, 680–685
- 34 Benedict, C. M., Ren, L. and Clawson, G. A. (1995) *Biochemistry* **34**, 9587–9598
- 35 Klausner, R. D. and Sittia, R. (1990) *Cell* **62**, 611–614
- 36 Ward, C., Omura, S., and Kopito, R. R. (1995) *Cell* **83**, 121–127
- 37 Jensen, T. J., Loo, M. A., Pind, S., Williams, D. B., Goldberg, A. L. and Riordan, J. R. (1995) *Cell* **83**, 129–135
- 38 Finger, A., Knop, M. and Wolf, D. H. (1993) *Eur. J. Biochem.* **218**, 565–574
- 39 Sommer, T. and Jentsch, S. (1993) *Nature (London)* **365**, 176–179
- 40 Townsend, A. and Trowsdale, J. (1993) *Semin. Cell Biol.* **4**, 53–61
- 41 Kleijmeer, M. J., Kelly, A., Geuze, H. J., Slot, J. W., Townsend, A. and Trowsdale, J. (1992) *Nature (London)* **357**, 342–344
- 42 Lilley, K. S., Davison, M. D. and Rivett, A. J. (1990) *FEBS Lett.* **262**, 327–329
- 43 DeMars, R. and Spies, T. (1992) *Trends Cell Biol.* **2**, 81–86
- 44 Frenzel, F., Kuhn-Hartman, I., Gernold, M., Gött, P., Seelig, A. and Kloetzel, P. M. (1993) *Eur. J. Biochem.* **216**, 119–126

Subcellular localization of proteasomes and their regulatory complexes in mammalian cells

Paul BROOKS*, Graciela FUERTES†, Rachael Z. MURRAY*, Suchira BOSE*, Erwin KNECHT†, Martin C. RECHSTEINER‡, Klavs B. HENDIL§, Keiji TANAKA¶, Julian DYSON|| and A. Jennifer RIVETT*¹

*Department of Biochemistry, University of Bristol, School of Medical Sciences, Bristol BS8 1TD, U.K., †Instituto de Investigaciones Citológicas, Amadeo de Saboya 4, 46010-Valencia, Spain, ‡Department of Biochemistry, University of Utah Medical Center, 50 North Medical Drive, Salt Lake City, UT 84132, U.S.A., §August Krogh Institute, University of Copenhagen, Universitetsparken 13, DK-2100, Copenhagen O, Denmark, ¶The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science 18-22, Honkomagome 3-chome, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan, and ||MRC Clinical Sciences Centre, Royal Postgraduate Medical School, Hammersmith Hospital, DuCane Road, London W12 0NN, U.K.

Proteasomes can exist in several different molecular forms in mammalian cells. The core 20S proteasome, containing the proteolytic sites, binds regulatory complexes at the ends of its cylindrical structure. Together with two 19S ATPase regulatory complexes it forms the 26S proteasome, which is involved in ubiquitin-dependent proteolysis. The 20S proteasome can also bind 11S regulatory complexes (REG, PA28) which play a role in antigen processing, as do the three variable γ -interferon-inducible catalytic β -subunits (e.g. LMP7). In the present study, we have investigated the subcellular distribution of the different forms of proteasomes using subunit specific antibodies. Both 20S proteasomes and their 19S regulatory complexes are found in nuclear, cytosolic and microsomal preparations isolated from rat liver. LMP7 was enriched approximately two-fold compared with core α -type proteasome subunits in the microsomal preparations. 20S proteasomes were more abundant than 26S proteasomes, both in liver and cultured cell lines. Interestingly, some

significant differences were observed in the distribution of different subunits of the 19S regulatory complexes. S12, and to a lesser extent p45, were found to be relatively enriched in nuclear fractions from rat liver, and immunofluorescent labelling of cultured cells with anti-p45 antibodies showed stronger labelling in the nucleus than in the cytoplasm. The REG was found to be localized predominantly in the cytoplasm. Three- to six-fold increases in the level of REG were observed following γ -interferon treatment of cultured cells but γ -interferon had no obvious effect on its subcellular distribution. These results demonstrate that different regulatory complexes and subpopulations of proteasomes have different distributions within mammalian cells and, therefore, that the distribution is more complex than has been reported for yeast proteasomes.

Key words: ATPase complex, interferon- γ , PA28, 19S complex, 11S regulator.

INTRODUCTION

Proteasomes play a major role in non-lysosomal proteolysis in eukaryotic cells (reviewed in [1,2]). They are responsible for the breakdown of short-lived proteins and play a role in transcriptional regulation and in cell cycle control. Proteasomes are also involved in antigen processing. The structural prototype is the proteasome isolated from *Thermoplasma acidophilum*, which has four stacked heptameric rings forming an $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$ cylindrical structure with the catalytic sites located in the β -subunits facing the inside of the cylinder. Cleavage of an N-terminal propeptide from β -subunits accompanies assembly of the complex and exposes the N-terminal threonine residue, which acts as the catalytic nucleophile. 20S proteasomes in animal cells are made up of at least 14 different subunits. Seven different α -type subunits make up the two outer rings of the cylindrical structure, and seven β -type proteasome subunits make up each of the two inner rings. There are three extra β -type proteasome subunits in animal cells compared with yeast. These three extra subunits, LMP2, LMP7 and MECL1, are inducible by γ -interferon and have been implicated in the antigen processing function of proteasomes (reviewed in [3]). A recent report [4] suggests cooperative incorporation of the inducible subunits into immuno-

proteasomes replacing the three other closely related β -type subunits.

A regulatory complex (called 19S regulatory complex, 19S cap, PA700 or ATPase complex) binds to each end of the 20S proteasome to form the 26S proteasome. The regulatory complexes contain approximately 20 different subunits, which vary in size from 25–110 kDa [5,6]. Six of the subunits have ATPase activity. One of the non-ATPase regulatory subunits has been demonstrated to bind multi-ubiquitin chains [7], and the 26S form of the proteasome is responsible for the breakdown of proteins by the ubiquitin–proteasome pathway [8] as well as for some ubiquitin-independent protein degradation.

A second proteasome regulatory complex, the 11S regulator (REG) [9] or PA28 [10], like the 19S regulator, activates the multiple peptidase activities of 20S proteasomes. However, it differs from the 19S complex in two respects. So far, it has not been shown to activate protein degradation by the 20S proteasome, and it does not require ATP for assembling with and activating the 20S proteasome. REG is a ring-shaped complex consisting of two types of subunits, α and β . The two polypeptides have similar molecular masses of approximately 30 kDa. They are products of distinct but homologous genes and their primary structures are approximately 50% identical [11]. The two sub-

Abbreviations used: ECL, enhanced chemiluminescence; ER, endoplasmic reticulum; REG, 11S regulatory complexes.

¹To whom correspondence should be addressed (e-mail j.rivett@bris.ac.uk).

units were shown to have significant sequence identity [about 35%] with a previously described protein, the nuclear Ki antigen [12] or REG γ , which can also activate the proteasome [13]. The function of REG is not well understood although γ -interferon induces synthesis of REG α - and β -subunits and there are results suggesting a role in antigen processing [14].

We have shown previously, by immunogold electron microscopy, immunofluorescence and subcellular fractionation methods using polyclonal antibodies, that 20S proteasomes are localized in the nucleus and in the cytoplasm of mammalian cells [15,16]. A small percentage of the total proteasomes (< 20%) are loosely associated with the cytoplasmic surface of the endoplasmic reticulum (ER) [15,16]. In contrast, the ER/nuclear envelope appears to be the major site for proteasomes in fission and budding yeast [17,18]. The present studies were undertaken to examine the subcellular distribution of the different subpopulations of proteasomes in mammalian cells using subunit-specific antibodies and also to investigate the effects of γ -interferon on the distribution of proteasomes and their regulatory complexes. The results show differences in the distribution of different subpopulations of 20S and 26S proteasomes, and also in the 11S regulatory complexes. Such differences are probably significant for their functions and may vary in different cell types.

EXPERIMENTAL

Purification of proteasome complexes and REG

Proteasomes (20S and 26S) were purified from rat liver as described previously [19,20]. Chymotrypsin-like activity of proteasomes was assayed [19] using 10–40 μ M succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-methylcoumarin (Peptide Institute, Japan) as substrate. Recombinant REG α was purified as described previously [13].

Preparation of subcellular fractions from rat liver and separation of 20S and 26S proteasomes by gel filtration

Subcellular fractionation of rat liver was carried out as described previously [16] and nuclear, cytosolic and microsomal fractions used for immunoblot analysis. For separation of 26S and 20S proteasomes by gel filtration, livers were washed and then homogenized in a Waring blender in 4 vol. of 20 mM Tris/HCl buffer, pH 7.5, containing 20% (v/v) glycerol, 1 mM 2-mercaptoethanol, 0.1 mM EDTA and 5 mM ATP for 3 \times 30 s at full speed with 1 min intervals. The homogenate was then centrifuged for 1 h at 95000 *g* and the resulting supernatant separated by gel filtration. Gel filtration was carried out using a Superose 6 FPLC column (Pharmacia) equilibrated with 20 mM Tris/HCl buffer, pH 7.5, containing 100 mM NaCl and 10% (v/v) glycerol.

Antibodies and immunoblotting

Mouse monoclonal antibodies, MCP72 and MCP257 [21], which recognize the C8 and C9 α -type proteasome subunits, respectively, were used along with rabbit polyclonal anti-20S proteasome antibodies [22] to investigate the total proteasome population. Mouse monoclonal antibodies to the 26S proteasome subunits p45 (p45-110) and TBP1 (TBP1-19) were raised to recombinant proteins. Antibodies to the inducible proteasome β -subunits, LMP2 and LMP7, were also mouse monoclonal antibodies (LMP2-13 and LMP7-1). Rabbit polyclonal antibodies against the 26S proteasome subunit S3 (p91A) were a gift from Dr Amar-Costesec (Universite Catholique de Louvain, Brussels, Belgium) [23]. Anti-S12 antibodies were raised in rabbits as

described previously [24] and affinity purified against purified rat liver 26S proteasomes before use. Anti-REG polyclonal antibodies were raised against REG (anti-REG) or against ubiquitin fusion proteins to a unique region in REG α and REG β for subunit specific antibodies. REG γ antibodies were rabbit polyclonal antibodies raised against a γ -specific peptide [25]. Anti-REG antibodies were affinity purified against recombinant REG α protein before use.

For immunoblot analysis, samples containing known amounts of protein [26] were run on SDS/PAGE gels [27] and immunoblotting was carried out using either an enhanced chemiluminescence (ECL) detection kit (New England Nuclear) or an alkaline phosphatase detection system, as indicated in the Figure and Table legends. Quantification of immunoblots was carried out by densitometric analysis. Purified 20S proteasomes, 26S proteasomes and recombinant REG α were used to establish the linearity of the method and as standards for the quantification.

Cell culture

Human embryo lung L132 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (GIBCO BRL) supplemented with 10% (v/v) new-born bovine serum, penicillin (50 units/ml) and streptomycin (50 μ g/ml) in a humidified atmosphere of 5% (v/v) CO₂/air.

Immunofluorescence microscopy

Immunofluorescent labelling was carried out as described previously [28], except that cells were fixed in methanol or paraformaldehyde and incubations with primary antibodies were for 2 h at room temperature followed by incubation with pre-immune serum for 15 min and then incubation overnight at 4 °C with rabbit anti-mouse fluorescein-conjugated antibodies. For controls, primary antibodies were omitted. A Leica upright confocal microscope was used to examine the slides. For immunofluorescence studies to investigate the effect of γ -interferon, subconfluent cultures were grown in the presence or absence of 250 units/ml of γ -interferon for 2–3 days.

RESULTS

Proteasome regulatory subunits occur only in complexes in rat liver

Rat liver extracts, which were prepared in the presence of ATP and glycerol to stabilize 26S proteasomes, were fractionated by gel filtration on a Superose 6 column (Figure 1). Assays of rat liver 26S and 20S proteasomes separated on this column showed maximal 26S proteasome activity in fractions 21–23 and maximum 20S proteasome activity in fractions 25–27 (Figure 1A). Assays of activity with succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-methylcoumarin showed that most but not all of the activity measured using this substrate was due to proteasomes. An additional small peak of hydrolytic activity of a lower molecular-mass protease was detected in fractions 33–34 of fractionated rat liver extracts (Figure 1A) and in equivalent fractions from cultured cells. The substrate should therefore not be regarded as completely specific for proteasomes, although in thymocyte extracts, where there are relatively higher levels of proteasomes, the assay does appear to be specific [24].

Immunoblots were carried out with the fractions from the gel-filtration column (Figure 1B) to investigate the distribution of individual subunits of proteasomes and their regulators in different complexes. Antibodies against the chosen subunits of

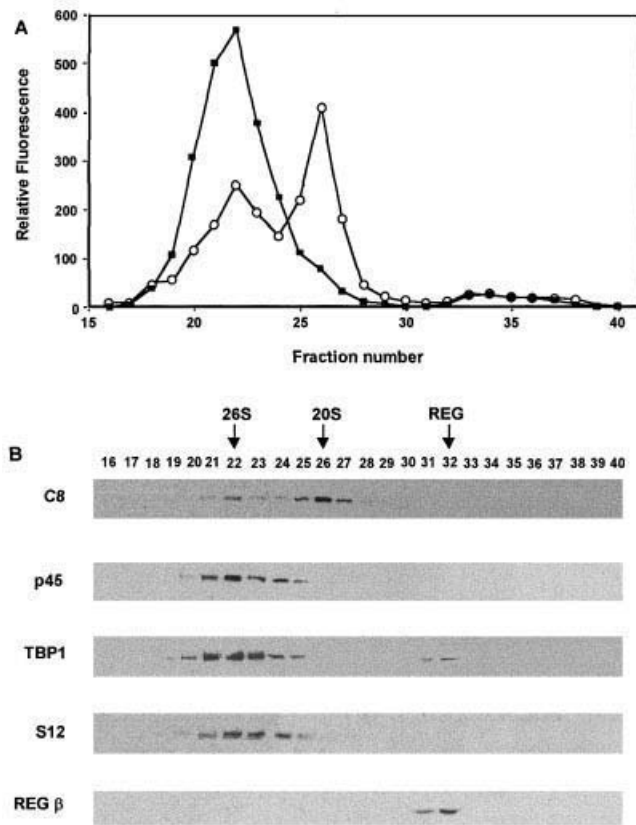


Figure 1 Immunoblot analysis of subunits in proteasome complexes from rat liver

Soluble extracts of rat liver were fractionated by gel filtration on a Superose 6 column as described in the Experimental section. (A) Assays for proteasome activity were performed with succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-methylcoumarin as substrate under conditions optimized for 26S proteasomes (+ ATP, ■) and for activation of latent 20S proteasomes (+ 0.02% SDS, ○). (B) Samples of each fraction (50 μ l) from the gel filtration were separated by SDS/PAGE and immunoblotted using anti-C8 antibodies, anti-regulatory complex subunits p45, TBP1 and S12 antibodies and anti-REG β antibodies, as indicated in the Figure. Free subunits, if present, would be expected to appear in fractions 35–40 (molecular mass approx. 30–100 kDa).

20S proteasomes (C8, C9, LMP7) or their REG or 19S regulatory complexes (p91A, p45, TBP1, S12) were all found to be specific for the appropriate subunit. The 20S proteasome α -type subunits, C8 (Figure 1B) and C9 (results not shown), were found only in fractions where 26S and 20S proteasomes occur (Figure 1B). The relatively stronger C8 bands in fractions 25–27 compared with 21–23 show that the level of 20S proteasomes is higher than that of 26S proteasomes in rat liver extracts. Quantification of the relative levels of C8 or C9 in 20S and 26S proteasome fractions, using purified complexes as standards, indicated that levels of free 20S proteasomes were always greater than those of 26S proteasomes.

Subunits of the 19S regulatory complex (S12 and the ATPase subunits, p45 and TBP1) were all present predominantly in fractions containing the 26S proteasome (Figure 1B), suggesting that there is little, if any, free 19S complex, and no free subunits were detected for any of these subunits. A small amount of TBP1 was observed in fractions 31–32, which is consistent with the occurrence of this subunit in a modulator complex of molecular mass 250 kDa [29]. p91A was also detected only in fractions containing 26S proteasomes.

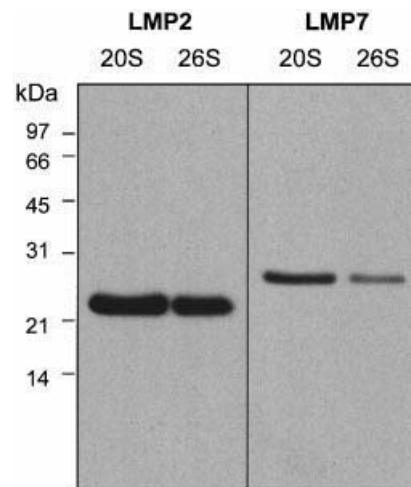


Figure 2 Inducible proteasome subunits, LMP2 and LMP7, are present in purified rat liver 26S proteasome preparations as well as in 20S proteasomes

Purified rat liver 20S proteasomes (1 μ g) (left lanes) and purified rat liver 26S proteasomes (3 μ g) (right lanes) were separated by SDS/PAGE and the gels were immunoblotted with anti-LMP2 and anti-LMP7 antibodies, as indicated, and detected by ECL.

Under the fractionation conditions employed, reactivity with anti-REG antibodies was seen in fractions 31–32 (Figure 1B) where the free 11S complex would be expected. These results differ from those of Hendil et al. [30] and Ahn et al. [31], who found REG (PA28) associated with 20S proteasomes. The differences in our results can be explained by the limited stability of REG–20S proteasome complexes, which dissociate in the buffer chosen to optimize recovery of 26S proteasomes. The variable γ -interferon-inducible proteasome β -subunits, LMP2 and LMP7, were found to be present in 26S proteasomes as well as in 20S proteasomes. This was confirmed by Western-blot analysis of rat liver 20S and 26S proteasomes, which had been purified to apparent homogeneity (Figure 2). The relative level of LMP7 in the 26S proteasomes was found to be approximately half of that in 20S proteasomes, when quantified by loading equal molar amounts of 20S and 26S proteasomes on to the gels.

Differences in the distribution of proteasome complexes in subcellular fractions from rat liver

Analysis of the localization of 20S proteasomes in subcellular fractions from rat liver has been described previously [16]. The relative distribution of different proteasome regulatory complexes in rat liver subcellular fractions was investigated using the same procedures. In these experiments, polyclonal anti-proteasome antibodies were used to show the distribution of total proteasomes, which was compared with that of immunoproteasomes detected with anti-LMP7 (Table 1). The immunoproteasomes were slightly but significantly enriched in the microsomal fractions and there was a corresponding decrease in the cytoplasmic ratio of LMP7 to total proteasomes (Table 1).

Subunits of the 19S regulatory complexes, like core 20S proteasomes, were found in the nucleus as well as in the cytoplasm and associated with the ER. However, some significant differences were observed in the ratio of different subunits of 19S complexes in different subcellular locations (Table 1), suggesting the possibility that the 26S proteasome can vary in its precise subunit composition. TBP1 and p91A subunits of the 26S proteasome

Table 1 Distribution of proteasome complexes in subcellular fractions from rat liver

Subcellular fractions were prepared from rat liver. The percentage of each subunit in the three fractions was determined by quantification of immunoblots, where equal amounts of protein had been loaded for each fraction and which had been developed using alkaline phosphatase-conjugated antibodies. The data (means \pm S.D.) were derived from the number of different subcellular fractionation experiments indicated (*n*). Values obtained with subunit-specific antibodies for immunoproteasome (Immuno 20S) subunit LMP7, for subunits of the 19S regulatory complex (RC), p91A, p45, TBP1, and S12, and for REG were significantly different from those obtained with polyclonal anti-proteasome antibodies at: **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.0025 and *****P* < 0.0005 respectively. Statistical analyses were carried out using the Student's *t* test.

Subunit	Complex	<i>n</i>	Nuclei	Cytosol	Microsomes
Several (anti-proteasome)	20S	4	5.4 \pm 1.6	83.2 \pm 3.4	11.3 \pm 2.0
LMP7	Immuno20S	4	5.5 \pm 1.2	75.0 \pm 3.3**	19.5 \pm 2.6***
p91A	19S RC	4	5.3 \pm 0.8	78.5 \pm 3.1*	16.2 \pm 2.9*
p45 ATPase	19S RC	4	10.8 \pm 1.5***	75.4 \pm 2.6**	13.8 \pm 1.5*
TBP1 ATPase	19S RC	3	6.8 \pm 0.7	77.7 \pm 3.2*	15.4 \pm 2.6*
S12	19S RC	3	26.1 \pm 11.6*	53.3 \pm 7.9****	20.6 \pm 4.9*
REG	11S REG	4	1.5 \pm 0.4***	84.6 \pm 2.1	13.9 \pm 2.1

Table 2 Effect of ATP on ER association of 20S proteasomes and 19S regulatory complexes

The data were derived from immunoblots as described in Table 1. Microsomes were prepared from rat liver homogenized in the absence of ATP (control) or in the presence of ATP (+ATP). Values obtained for each of the subunit-specific antibodies between preparations in the presence and absence of ATP were significantly different at: ***P* < 0.01 and *****P* < 0.0005 respectively. Statistical analyses were carried out using the Student's *t* test.

Antibody	<i>n</i>	Control	+ATP
Anti-C8	5	12.4 \pm 1.3	21.0 \pm 3.2****
Anti-C9	6	9.9 \pm 2.2	21.4 \pm 2.6****
Anti-p45	4	7.2 \pm 2.4	23.4 \pm 7.3**
Anti-REG	4	12.6 \pm 2.0	12.7 \pm 2.2

had a similar distribution to each other. The relative amount of 19S regulatory complexes associated with microsomal fractions was significantly greater than 20S proteasomes. There was a significant difference in the distribution of ATPase subunits p45 and TBP1; p45 was significantly higher than TBP1 in nuclear fractions. Even more strikingly, the non-ATPase subunit S12 was relatively low in the cytoplasm but high in nuclear and microsomal preparations. REG showed a similar microsomal/cytosolic ratio to total proteasomes but was only present at very low levels in nuclear preparations (Table 1).

In order to investigate whether addition of ATP, which stabilizes the 26S proteasome, had an effect on the level of proteasomes associated with microsomal fractions, subcellular fractionation was carried out in the presence or absence of ATP. The results shown in Table 2 indicate that both 26S component p45 and core 20S proteasome subunits C8 and C9 were increased in microsomes prepared in the presence of ATP. The level of microsome-associated REG did not change in the presence of ATP.

The level and distribution of 20S and 26S proteasomes in cultured cells

Because proteasome subunits p45 and C8 are found only in proteasome complexes, the ratio of the levels of these subunits can be taken as a measure of the relative amounts of 26S and 20S proteasomes. We have quantified the amounts of these complexes using purified 26S and 20S proteasomes as standards. The immunoblot analysis of extracts for a variety of cultured cells and for rat liver showed that, in all cases, there was an excess of

20S proteasomes. These results are consistent with values for 26S/20S ratios obtained after separation of 26S and 20S proteasomes by gel filtration, carried out under conditions which optimize recovery of intact 26S proteasomes, both with rat liver (Figure 1) and with L132 cells (results not shown). The levels of 20S and 26S proteasomes in L132 cells were determined by quantitative immunoblot analysis using C8 and p45 antibodies with purified 20S and 26S proteasomes as standards. The levels were: 6.9 \pm 1.6 μ g 20S proteasome/mg total protein (mean \pm S.E., *n* = 3) and 8.5 \pm 0.8 μ g 26S proteasomes/mg protein (mean \pm S.E., *n* = 3). Thus 20S proteasomes are present in a two- to three-fold molar excess over 26S complexes.

Since p45 subunits were present predominantly in 26S proteasomes, the antibodies were used also to investigate the localization of 26S proteasomes by immunofluorescence microscopy and compared with the distribution of total proteasomes detected using antibody MCP20, which binds to the core 20S proteasome α -type subunit C2. Results from immunofluorescent labelling of cultured human embryo lung L132 cells with MCP20 gave roughly equal intensity of labelling of nucleus and cytoplasm (Figure 3A). Anti-p45 antibodies, on the other hand, showed that p45 is mostly nuclear but is also present in the cytoplasm of L132 cells (Figure 3B). Similar results were obtained with HeLa cells. The results are consistent with those of Peters et al. [32], who found that 19S complexes were present in the nucleus and in the cytoplasm of *Xenopus* oocytes and in mammalian cells.

Localization of the REG in cultured cells

Levels of REG α and β increase 3- to 4-fold following treatment of L-132 cells with γ -interferon (Figure 4). Tanahashi et al. [25] reported an almost complete loss of REG γ protein after interferon treatment in SW620 cells. However, we observed only a minor decrease in its level in L132 cells, as determined by immunoblot analysis and immunofluorescence (Figure 4 and Figure 5). To investigate whether this increase in levels of REG results in any changes in subcellular distribution of the activator, L132 cells were grown in the absence or presence of γ -interferon for 0-4 days. Since the half-life of proteasomes in L-132 cells was about one day and the induction of γ -interferon-inducible proteasome and regulator subunits was maximal within two days, any major effects of γ -interferon on localization of REG would be expected to be observed within a few days. Immunofluorescence studies with anti-REG α and anti-REG β showed REG, REG α and REG β to be mostly cytosolic (Figures 5A and 5C). A small amount of labelling was observed in the nucleus but

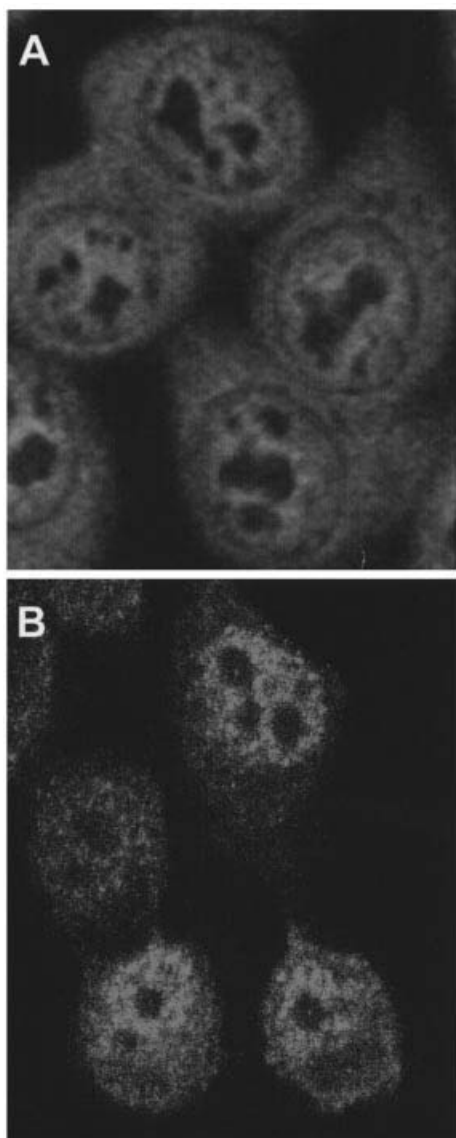


Figure 3 Immunofluorescent labelling of cells for 20S proteasomes and an ATPase subunit of the 19S complex

L132 cells were fixed with 3% paraformaldehyde and immunofluorescence microscopy was carried out as described in the Experimental section with (A) anti-C2 antibodies for 20S proteasomes and (B) anti-P45 antibodies for 26S proteasomes.

not in the nucleoli. The presence of γ -interferon had no apparent effect on the distribution of these subunits between the cytoplasm and the nucleus (Figures 5B and 5D). In agreement with its initial description as a nuclear antigen [12], REG γ was found to be present exclusively in the nucleus of L132 cells (Figure 5E) and γ -interferon had no effect on the distribution of REG γ (Figure 5F).

DISCUSSION

The results presented show that subunits of proteasomes and proteasome regulatory complexes do not occur at significant levels as free subunits. The levels of the different complexes can therefore be determined by immunoblot analysis using appro-

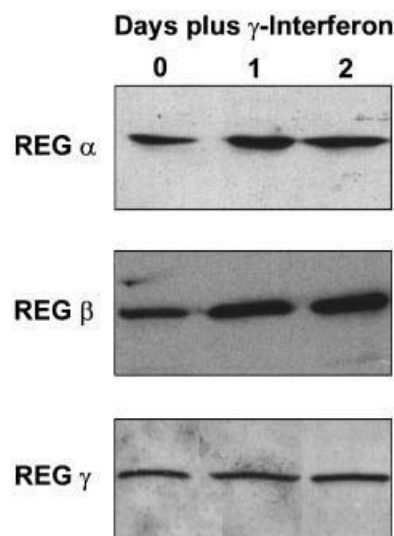


Figure 4 Effect of γ -interferon on levels of REG proteins

Human embryo lung L132 cells were treated with γ -interferon (250 units/ml) for 0, 1 or 2 days, and the total cell extract (100 μ g) was separated by SDS/PAGE and the gel was immunoblotted with antibodies against the REG α -subunit, REG β -subunit and the related Ki antigen (REG γ) using subunit-specific antibodies. Relative levels of REG were determined by densitometric analysis.

ropriate subunit-specific antibodies, such as antibodies to C2, C8 or C9 for core 20S proteasomes and antibodies for LMP2 or LMP7 for immunoproteasomes. Since there is little, if any, free 19S complex, anti-p45 antibodies can be used for investigation of the level and distribution of 26S proteasomes as well as for 19S regulatory complexes. A two- to three-fold excess of 20S proteasome was observed both in rat liver and in cultured cell lines. It is possible that the 20S proteasome can function alone, but it is also likely that 11S REG-20S proteasome complexes form *in vivo*. The fact that little if any of this complex was detected in our fractionated cell extracts is probably due to the conditions chosen for the gel filtration, since others have observed these complexes under different conditions [30,31].

The results with antibodies against α -type proteasome subunits (C2, C8, C9) confirm earlier observations that 20S proteasomes are localized in the nucleus and in the cytoplasm, and are associated with the cytoplasmic surface of the ER [15,16]. The microsome-associated proteasomes are localized mainly in the smooth ER and they can be removed from the membranes by extensive washing [16]. The latter may lead to an underestimate of proteasome levels in isolated microsomal fractions. The association of 26S proteasomes with microsomes is highly significant for ER-associated protein degradation, much of which may be ubiquitin dependent (reviewed in [33]). The ratio of 26S proteasomes to 20S proteasomes is greater in the nucleus than in the cytosol, as observed by immunofluorescence microscopy of L132 cells and by subcellular fractionation of rat liver. The fact that the immunofluorescence results are more striking than the immunoblot analysis can be explained by the relatively low volume of liver nuclei [15], and by differences in the methods employed. Peters et al. [32] also found that 19S regulatory complexes of 26S proteasomes were enriched in nuclei in several, but not all, cell types, which they tested by immunofluorescence.

LMP7 was found to be enriched in microsomal proteasomes, as found previously for LMP2 [16], and, since the three γ -

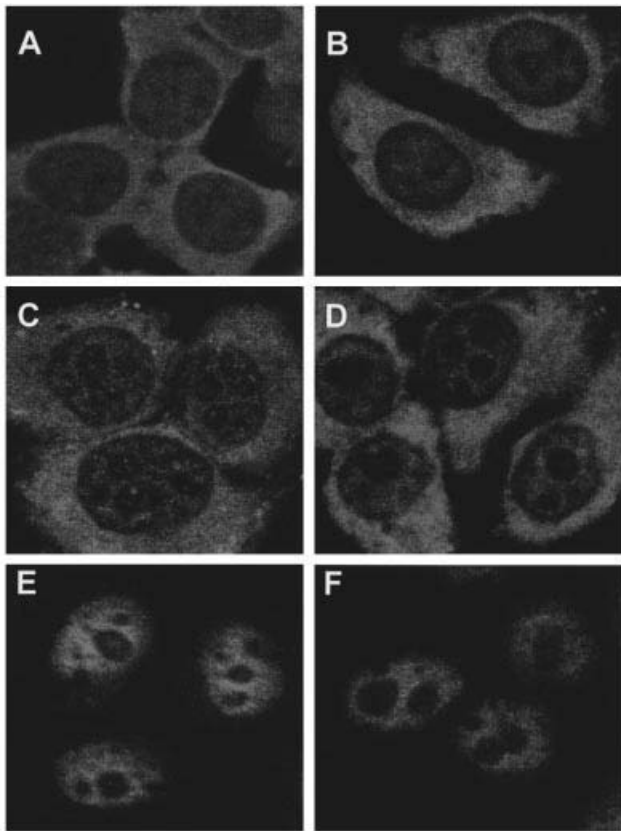


Figure 5 Localization of REG and the effects of γ -interferon

L132 cells were cultured on coverslips in the absence (**A**, **C** and **E**) or presence (**B**, **D** and **F**) of 250 units/ml γ -interferon. Cells were fixed with methanol and immunofluorescence microscopy was carried out using FITC-conjugated secondary antibodies with anti-REG α (**A** and **B**), anti-REG β (**C** and **D**) and anti-REG γ (**E** and **F**) antibodies.

interferon-inducible subunits are apparently incorporated together [4], this result suggests that antigenic peptides may be produced at the ER for efficient transport by the transporter associated with antigen processing (TAP) transporter. The presence of LMP2 and LMP7 in 26S proteasomes (but to a lesser extent than in 20S proteasomes) is consistent with a role for 26S proteasomes and possibly ubiquitin-dependent proteolysis in antigen processing [34].

Some differences in the structure of 19S regulatory complexes have been suggested previously based on results of immunoprecipitation from [35 S]methionine-labelled cells [35]. Variations in the distribution of individual subunits of the 19S complexes found in this study provide some evidence in support of this view. Sequence similarities between some non-ATPase components (S12 and POH1 [36]) may also reflect heterogeneity in the regulatory components as well as in the catalytic core of the 26S proteasome.

Our finding that both REG α and REG β subunits are present mainly in the cytoplasm of liver and L132 cells is in agreement with results of other immunofluorescence studies by Wojcik et al. [37] in NT2 neuronal precursor cells and HeLa S3 cells, although Soza et al. [38] reported that both REG subunits were distributed almost equally between the cytoplasm and nucleus of mouse fibroblast B8 cells. Our results show no major difference in

subcellular distribution of REG following treatment with γ -interferon. The distribution of the γ -interferon-inducible REG in the cytoplasm may reflect its proposed role in antigen processing, which is believed to occur predominantly in the cytoplasm. The function of the nuclear REG γ and its role, if any, in interacting with nuclear proteasomes has not been established.

Recent studies have elucidated the localization of proteasomes in yeast [17,18,39]. With green-fluorescent-protein-tagged subunits, proteasomes appeared to be predominantly associated with the nuclear envelope/ER [17,18]. However, using smaller tags, Russell et al. [39] found yeast proteasomes to be distributed throughout the nucleus with only very low levels, if any, in the cytoplasm. Moreover, they found that the level of subunits of the 19S regulatory complex of 26S proteasomes were present in yeast at the same level as a core 20S proteasome subunit. These results are consistent with our observations that 26S proteasomes are relatively more abundant in the nuclei of mammalian cells and that they are distributed throughout the nucleus. Some 26S proteasomes are associated with the ER. The finding that 20S proteasomes are more abundant than 19S regulatory complexes of 26S proteasomes in mammalian cells presumably permits binding of 20S proteasomes to REG complexes which, like the γ -interferon-inducible proteasome subunits, are absent in yeast. Yeast also appear to lack the proteasome modulator complex [39], which has been observed in mammalian cells [29]. The abundance of proteasomes in nuclei in yeast may reflect their critical role in the regulation of cell-cycle progression in rapidly dividing cells. In contrast, mammalian cells in tissues are generally not rapidly proliferating and proteasomes have some additional specialized functions, such as in antigen processing.

This work was supported by the Medical Research Council and by the Wellcome Trust (A.J.R.), and by Fundacion 'la Caixa' (97/131/00) and DGESI (97-1445) (E.K.). P.B. was supported by a studentship from the Biotechnology and Biological Sciences Research Council. Immunofluorescence microscopy was carried out in the University of Bristol School of Medical Sciences Cell Imaging Facility, which was funded by a Medical Research Council Infrastructure Award.

REFERENCES

- Coux, O., Tanaka, K. and Goldberg, A. L. (1996) *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 801–847
- Hilt, W. and Wolf, D. H. (1996) *Trends Biochem. Sci.* **21**, 96–102
- Tanaka, K., Tanahashi, N., Tsurumi, C., Yokata, K. Y. and Shimbara, N. (1997) *Adv. Immunol.* **64**, 1–38
- Griffin, T. A., Nandi, D., Cruz, M., Fehling, H. J., VanKaer, L., Monaco, J. J. and Colbert, R. A. (1998) *J. Exp. Med.* **187**, 97–104
- Dubiel, W. and Rechsteiner, M. (1998) *Adv. Mol. Cell Biol.* **27**, 129–163
- Tanaka, K. and Tsurumi, C. (1997) *Mol. Biol. Rep.* **24**, 3–11
- Deveraux, Q., Ustrell, V., Pickart, C. and Rechsteiner, M. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 7059–7061
- Ciechanover, A. (1998) *EMBO J.* **17**, 7151–7160
- Dubiel, W., Pratt, G., Ferrell, K. and Rechsteiner, M. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 22369–22377
- Chu-Ping, M., Willy, P. J., Slaughter, C. A. and DeMartino, G. N. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 22514–22519
- Ahn, K., Tanahashi, N., Akiyama, K., Hismatsu, H., Noda, C., Tanaka, K., Chung, C., Shimbara, N., Willy, P., Mott, J., Slaughter, C. and DeMartino, G. (1995) *FEBS Lett.* **366**, 37–42
- Nikaido, T., Shimada, K., Shibata, M., Hata, M., Sakamoto, M., Takasaki, Y., Sato, C., Takahashi, T. and Nishida, Y. (1990) *Clin. Exp. Immunol.* **79**, 209–214
- Realini, C., Jensen, C. C., Zhang, Z., Johnston, S. C., Knowlton, J. R., Hill, C. P. and Rechsteiner, M. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 25483–25492
- Groettrup, M., Soza, A., Eggers, M., Kuehn, L., Dick, T. P., Schild, H., Rammensee, H. G., Kosinowski, U. H. and Kloetzel, P. M. (1996) *Nature (London)* **381**, 166–168
- Rivett, A. J., Palmer, A. and Knecht, E. (1992) *J. Histochem. Cytochem.* **40**, 1165–1172
- Palmer, A., Rivett, A. J., Thomson, S., Hendil, K. B., Butcher, G. W., Fuertes, G. and Knecht, E. (1996) *Biochem. J.* **316**, 401–407
- Enekel, C., Lehmann, A. and Kloetzel, P. M. (1998) *EMBO J.* **17**, 6144–6154

- 18 Wilkinson, C. R. M., Wallace, M., Morpew, M., Perry, P., Allshire, R., Javerzat, J-P., McIntosh, J. R. and Gordon, C. (1998) *EMBO J.* **17**, 6465–6476
- 19 Rivett, A. J., Savory, P. J. and Djaballah, H. (1994) *Methods Enzymol.* **244**, 331–350
- 20 Reidlinger, J., Pike, A. M., Savory, P. J., Murray, R. Z. and Rivett, A. J. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 24899–24905
- 21 Kristensen, P., Johnsen, A. H., Uerkvitz, W., Tanaka, K. and Hendil, K. B. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **205**, 1785–1789
- 22 Rivett, A. J. and Sweeney, S. T. (1991) *Biochem. J.* **278**, 171–177
- 23 Verlant, V., Amar-Costesec, A., Godelaine, D., Turu, C., Van-Pel, A., De-Plaen, E., Dautry-Varsat, A. and Beaufay, H. (1993) *Eur. J. Immunol.* **23**, 1727–1730
- 24 Beyette, J. R., Mason, G. G. F., Murray, R. Z., Cohen, G. M. and Rivett, A. J. (1998) *Biochem. J.* **332**, 315–320
- 25 Tanahashi, N., Yokota, K., Ahn, J. Y., Chung, C. H., Fujiwara, T., Takahashi, E., DeMartino, G. N., Slaughter, C. A., Toyonga, T., Yamamura, K., Shimbara, N. and Tanaka, K. (1997) *Genes to Cells* **2**, 195–211
- 26 Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 248–254
- 27 Laemmli, U.K. (1970) *Nature (London)* **227**, 680–685
- 28 Palmer, A., Mason, G. G. F., Paramio, J., Knecht, E. and Rivett, A. J. (1994) *Eur. J. Cell Biol.* **64**, 163–175
- 29 DeMartino, G. N., Prose, R. J., Moomaw, C. R., Strong, A. A., Song, X., Hisamatsu, H., Tanaka, K. and Slaughter, C. A. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 3112–3118
- 30 Hendil, K. B., Khan, S. and Tanaka, K. (1998) *Biochem. J.* **332**, 749–754
- 31 Ahn, K., Erlander, M., Leturcq, D., Peterson, P., Früh, K. and Yang, Y. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 18237–18242
- 32 Peters, J.-M., Franke, W. W. and Kleinschmidt, J. A. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 7709–7718
- 33 Sommer, T. and Wolf, D. H. (1997) *FASEB J.* **11**, 1227–1233
- 34 Rock, K. L. and Goldberg, A. L. (1999) *Annu. Rev. Immunol.* **17**, 739–779
- 35 Mason, G. G. F., Murray, R. Z., Pappin, D. and Rivett, A. J. (1998) *FEBS Lett.* **430**, 269–274
- 36 Spataro, V., Toda, T., Craig, R., Seeger, M., Dubiel, W., Harris, A. L. and Norbury, C. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 30470–30475
- 37 Wojcik, C., Tanaka, K., Paweletz, N., Naab, U. and Wilk, S. (1998) *Eur. J. Cell Biol.* **77**, 151–160
- 38 Soza, A., Knuehl, C., Groettrup, M., Henklein, P., Tanaka, K. and Kloetzel, P. M. (1997) *FEBS Lett.* **413**, 27–34
- 39 Russell, S. J., Steger, K. A. and Johnston, S. A. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 21943–21952

Received 24 August 1999/9 November 1999; accepted 25 November 1999



PERGAMON

The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 35 (2003) 651–664

IJBCB

www.elsevier.com/locate/ijbcb

Role of proteasomes in the degradation of short-lived proteins in human fibroblasts under various growth conditions

Graciela Fuertes, Adoración Villarroya, Erwin Knecht*

Instituto de Investigaciones Citológicas, Fundación Valenciana de Investigaciones Biomédicas, Amadeo de Saboya, 4, 46010 Valencia, Spain

Received 2 October 2002; received in revised form 2 December 2002; accepted 2 December 2002

Abstract

Degradation of proteins in the cells occurs by proteasomes, lysosomes and other cytosolic and organellar proteases. It is believed that proteasomes constitute the major proteolytic pathway under most conditions, especially when degrading abnormal and other short-lived proteins. However, no systematic analysis of their role in the overall degradation of truly short-lived cell proteins has been carried out. Here, the degradation of short-labelled proteins was examined in human fibroblasts by release of trichloroacetic acid-soluble radioactivity. The kinetics of degradation was decomposed into two, corresponding to short- and long-lived proteins, and the effect of proteasomal and lysosomal inhibitors on their degradation, under various growth conditions, was separately investigated. From the degradation kinetics of proteins labelled for various pulse times it can be estimated that about 30% of newly synthesised proteins are degraded with a half-life of approximately 1 h. These rapidly degraded proteins should mostly include defective ribosomal products. Deprivation of serum and confluent conditions increased the degradation of the pool of long-lived proteins in fibroblasts without affecting, or affecting to a lesser extent, the degradation of the pool of short-lived proteins. Inhibitors of proteasomes and of lysosomes prevented more than 80% of the degradation of short-lived proteins. It is concluded that, although proteasomes are responsible of about 40–60% of the degradation of short-lived proteins in normal human fibroblasts, lysosomes have also an important participation in the degradation of these proteins. Moreover, in confluent fibroblasts under serum deprivation, lysosomal pathways become even more important than proteasomes in the degradation of short-lived proteins.

© 2003 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: Intracellular protein degradation; Short-lived proteins; Defective ribosomal products; Proteasomes; Lysosomes

1. Introduction

Proteins are continuously being degraded in the cells. To accomplish this, several proteases occur, but

it is usually believed that in eukaryotic cells two main proteolytic systems are responsible of most of this degradation: proteasomes and lysosomes or vacuoles.

Many proteins become poly-ubiquitinated as a signal for selective proteasomal degradation (Mayer, 2000) and the basic biochemical steps of the ubiquitin-proteasomal pathways have been reviewed (Ciechanover, Orian, & Schwartz, 2000; Hershko &

* Corresponding author. Tel.: +34-96-339-1250;

fax: +34-96-360-1453.

E-mail address: knecht@ochoa.fib.es (E. Knecht).

Ciechanover, 1998; Pickart, 2001). Proteasomes are multi-subunit proteolytic complexes (Hilt & Wolf, 2000), localised in nucleus and cytosol (Knecht & Rivett, 2000; Rivett, 1998), which are responsible for the turnover of short-lived proteins, including misfolded, mislocated, mutant and damaged proteins (Kruger, Kloetzel, & Enenkel, 2001). In fact, several short-lived proteins such as cyclins, cyclin-dependent kinase inhibitors, I κ B- α , p53 and c-Jun, among many others, have been shown to be degraded by the ubiquitin–proteasome pathway (Laney & Hochstrasser, 1999). In addition, using proteasome inhibitors, it has been also found that most long-lived proteins are also degraded by proteasomes (Rock et al., 1994). Proteasomes can also degrade proteins by ubiquitin-independent mechanisms, as shown both in mammalian cells (Murakami et al., 1992) and in *Saccharomyces cerevisiae* (Gandre & Kahana, 2002) with ornithine decarboxylase, the key enzyme in the biosynthesis of polyamines. Therefore, there are multiple proteasomal degradative pathways (Attaix, Combaret, Pouch, & Taillandier, 2001).

Lysosomes appear responsible for the degradation of endocytosed proteins and of intracellular proteins under extreme catabolic situations (e.g. serum deprivation in cultured cells, starvation of animals, etc.). To degrade proteins, lysosomes contain in their lumen numerous proteolytic enzymes frequently called cathepsins (Pillay, Elliott, & Dennison, 2002) and there are various pathways whereby intracellular proteins can be incorporated into lysosomes to be degraded by these enzymes (Knecht, Martín de Llano, Andreu, & Moreno Miralles, 1998). Macroautophagy is the major pathway in the lysosomal degradation of intracellular components and in this classical autophagy large areas of cytoplasm, typically including whole organelles, are sequestered by a segregating structure and degraded by lysosomes (Klionsky & Emr, 2000; Ohsumi, 2001). But in addition to this pathway there are other lysosomal mechanisms to degrade intracellular proteins (Abeliovich & Klionsky, 2001; Cuervo & Dice, 1998; Knecht et al., 1998), including endocytosis, crinophagy, direct conversion of cisternae of the transitional part of the endoplasmic reticulum into lysosomes, microautophagy and chaperone-mediated autophagy.

The cell also contains various other proteases, such as calpains, which participate in Ca²⁺-mediated

degradative activity (Glading, Lauffenburger, & Wells, 2002; Perrin & Huttenlocher, 2002), and mitochondrial and other organellar proteases (Langer, Kaser, Klanner, & Leonhard, 2001). These proteases have more specialised roles but their contribution to the overall cellular protein turnover is unknown.

Intracellular proteins have vastly different half-lives ranging from less than 1 h to various days. Early studies in bacterial and mammalian cells (Goldberg & Dice, 1974; Poole & Wibo, 1973; Pine, 1972) identified, on the basis of their degradation kinetics, two main groups of proteins: “short-lived” (with a fast degradation rate) and “long-lived” (with a much slower degradation rate) proteins. Both kinetics of degradation were separated by a clear discontinuity and these two groups of proteins have been identified in all experimental systems analysed, including perfused liver, isolated hepatocytes and a large variety of cultured cells. The nature of these short-lived proteins is unknown and still matter of speculation.

It has been generally concluded, on the basis of experiments with various short-lived proteins and with abnormal and short-labelled proteins, that proteasomes are responsible of most, if not all, of the degradation of short-lived proteins (Glickman & Ciechanover, 2002; Lee & Goldberg, 1996). However, as firstly pointed out by Wheatley, Giddings, & Inglis, 1980, proteins labelled for short pulses with radioactive amino acids include a pool of long-lived proteins, whose size depends on the length of the pulse. Therefore, these “short-lived proteins” should be better called “short-labelled” proteins and it remains to be investigated the real participation of the various proteolytic pathways in the degradation of the bulk of truly short-lived proteins in the cells.

In this paper, we have carried out a thorough analysis of the contribution of proteasomes and of other proteolytic pathways, in particular macroautophagy, to the degradation of truly short-lived proteins in human fibroblasts under various growth conditions. We accomplished this by analysing separately the two pools of proteins (short- and long-lived proteins) that contribute to the decay of short-labelled proteins in pulse-chase experiments (Wheatley et al., 1980) and taking advantage of the availability now of several inhibitors of the proteasomal and lysosomal pathways. This is, to our knowledge, the first report on the participation of the various proteolytic pathways in the

overall degradation of truly short-lived proteins in eukaryotic cells under various growth conditions.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Lactacystin, *clasto* lactacystin β -lactone and epoxomicin were from Affiniti Research Products Limited, Mamhead, Exeter, UK. 3-Methyladenine was from Sigma, Saint Louis, Missouri, USA. Leupeptin was from Peptide Institute Inc., Osaka, Japan. L-[4,5- 3 H]leucine, L-[3,4(*n*)- 3 H]valine and [methyl- 3 H]thymidine were from Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg, Germany. Minimum essential medium (MEM) with Earle's salts, L-glutamine, MEM amino acids solution, MEM essential amino acids solution, MEM vitamins solution, antibiotics, foetal calf serum and trypsin-EDTA were from Gibco Invitrogen Corporation, Prat de Llobregat, Barcelona, Spain. Other reagents were of the best analytical quality available.

2.2. Cell culture

Human fibroblasts diagnosed as apparently normal (Repository no.: GM03349B and GM03348D) were obtained from the Coriell Institute for Medical Research (Camden, New Jersey, USA). They were cultured in monolayer using 75 and 25 cm² flasks in MEM with Earle's salts, L-glutamine (2 mM), 1X MEM amino acids, 1X MEM essential amino acids, 1X MEM vitamins, 100 units/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin and containing 20% foetal calf serum (complete MEM medium). All experiments were performed with human fibroblasts at 14–20 passage number to avoid effects of culture ageing. Cell viability was checked by trypan blue exclusion. Growth curves were determined in parallel for each culture with a hemacytometer, after harvesting the cells from the flasks or from 6-well plates at stated times with trypsin-EDTA. In some cases, growth curves were also analysed by [methyl- 3 H]thymidine (2 μ Ci/ml, 2 Ci/mmol) incorporation as described (Knecht, Hernández-Yago, & Grisolia, 1984). On the basis of these determinations, exponential and confluent growth phases were established for each cell line.

2.3. Measurements of the degradation of short-labelled proteins in human fibroblasts

Exponentially growing or confluent human fibroblasts in 25 cm² flasks were washed with phosphate buffered saline (PBS) and were incubated for 5 min in complete MEM medium without leucine plus 10% dialysed serum. Then, 100 μ l of [3 H]leucine (1 mCi/ml, 52 Ci/mmol) or of [3 H] valine (1 mCi/ml, 45 Ci/mmol) were added for the indicated pulse times. At the end of the pulses, cells were quickly washed at 37 °C with PBS containing 2 mM unlabelled L-leucine or 10 mM unlabelled L-valine to remove unincorporated [3 H]leucine or [3 H]valine, respectively and immediately incubated with fresh complete MEM medium, with or without serum as indicated, and containing 2 mM L-leucine or 10 mM L-valine to prevent reincorporation of the label released by degradation. At the different chase times, 2 \times 250 μ l aliquots of the media were precipitated in the cool with 5% (final concentration) trichloroacetic acid. In experiments without serum, bovine serum albumin (final concentration 4 mg/ml) was added to help in precipitation. Precipitates were dissolved in 0.2 N NaOH. Trichloroacetic acid-soluble and -insoluble radioactivity of the various aliquots was measured by liquid scintillation counting. At the end of the incubations, the radioactivity of the cells was measured, after treating the cell monolayers with ice-cold 10% trichloroacetic acid for 30 min and dissolving them in 0.2 N NaOH plus 0.4% Na-deoxycholate. All counts were corrected for quenching. Percentage of protein degradation was estimated as described (Vargas, Aniento, Cervera, & Knecht, 1989) from the ratio of the trichloroacetic acid-soluble radioactivity released to the medium at the different chase times and the trichloroacetic acid-precipitable radioactivity present in the cells at the start of the chase. Percentage of protein released to the medium was calculated in the same way from the trichloroacetic acid-precipitable fractions of the medium at the various chase times. Final results are expressed as percentage of the initial trichloroacetic acid-precipitable radioactivity present in the cells (% radioactivity remaining in cells) at the different chase times. These values are calculated by subtracting the percentage of protein degradation calculated as above from 100% (radioactivity in the cells at time 0).

2.4. Procedures to assess short-lived and long-lived protein degradation kinetics from the kinetics of short-labelled protein degradation

The mathematical model which justifies such calculations has been extensively discussed (Corella, Guillén, Hernández, & Hernández-Yago, 1998; Knecht, Hernández-Yago, Martínez-Ramón, & Grisolia, 1980; Wheatley, Grisolia, & Hernández-Yago, 1982). Briefly, protein degradation follows exponential kinetics. Thus, the decay of labelling during a chase period from a single pool of radioactively labelled proteins is expressed by the following equation: $n_t = n_0 \times e^{-kt}$, where n_t and n_0 represent the labelled protein present in the pool at time t of chase and at the beginning of the chase, respectively, and k is the turnover rate. Following the procedure described in Knecht et al. (1980), when the experimental decay curves of short-labelled radioactive proteins were plotted semilogarithmically and linear regression analysis was performed, the best fitted regression lines were obtained, at all pulse times, when two lines were considered, indicating two major groups (“pools”) of labelled proteins: long-lived and short-lived proteins. Thus, the experimental curve was decomposed into two exponential functions: one for long-lived proteins (calculated from the degradation values at the longer chase times: 8–24 h) and other for short-lived proteins (obtained by extrapolation of the first line to 0 time and subtraction of the calculated values from the experimental points at shorter chase times: 0–6 h). The intersection of both exponential functions with the y-axis represents the amount of labelled protein belonging to the two pools of proteins (n_L and n_S for long- and short-lived proteins, respectively). Half-lives ($t_{1/2}$) of both protein pools ($t_{1/2L}$ and $t_{1/2S}$ for long- and short-lived proteins, respectively) were calculated from the estimated values for k (k_L and k_S), using equation $t_{1/2} = -(\ln 2)/k$. Finally, the proportion of protein of the pools of short- (N_L) and long-lived (N_S) proteins present in the cells under steady-state conditions were calculated by resolving the following three equations (Wheatley et al., 1982; Corella et al., 1998): $N_L + N_S = 100$; $N_S = n_S/(1 - 2^{-t/t_{1/2S}})$; and $N_L = n_L/(1 - 2^{-t/t_{1/2L}})$, where t is the pulse time used in the corresponding experiment.

2.5. Experiments with proteolysis inhibitors

For these experiments, cells were seeded in 6-well plates at the calculated densities to yield exponentially growing and confluent cultures by the time of the addition of the inhibitors. After labelling the cells for 15 min with [³H]leucine or [³H]valine and washing the cells as above, the medium was supplemented with either 10 mM methyladenine, 20 mM NH₄Cl plus 0.1 mM leupeptin, 20 μM lactacystin, 20 μM *clasto* lactacystin β-lactone or 20 μM epoxomicin. Degradation was calculated as described under “measurements of the degradation of short-labelled proteins in human fibroblasts”, but 1 h after adding the inhibitors to the medium to allow them to reach the intracellular milieu and achieve their maximal inhibitory efficiency. Inhibitors were either added immediately after the 15 min pulse (to calculate inhibitions of short-labelled proteins at various time points during the 1–4 chase period) or at 8 h chase (to calculate inhibitions of long-lived proteins at various time points during the 9–12 h chase period, when short-lived proteins have been degraded), after washing the cells with PBS and adding fresh complete MEM medium, both containing 2 mM leucine or 10 mM valine. The day before the experiment, fresh inhibitor stock solutions were prepared (1 M NH₄Cl in water, 10 mM leupeptin in water, 8 mM lactacystin in water, 8 mM *clasto* lactacystin β-lactone in dimethyl sulfoxide and 8 mM epoxomicin in dimethyl sulfoxide) and kept at –20 °C until use. Control wells for the various inhibitors received the same concentrations of the inhibitor solvents.

Other general procedures were performed as previously described (Salvador, Aguado, Horst, & Knecht, 2000). All experiments were carried out at least four times with duplicate or triplicate samples.

3. Results

3.1. Degradation kinetics of proteins radiolabelled for 5, 15, 30 and 60 min in human fibroblasts

The degradation kinetics of proteins radiolabelled for different pulse-times in human fibroblasts was first analysed. [³H]leucine and [³H]valine-labelled human fibroblasts lost protein-radioactivity at a similar rate, indicating that leucine and valine are equally

valid as labelling amino acids for short-labelled proteins in these cells. However, when cells were incubated in parallel and under the same conditions with [^3H]leucine and [^3H]valine, the radioactivity incorporated into short-labelled proteins was about 1.5 to 1.6 times higher when using [^3H]leucine. Therefore, most experiments were carried out with [^3H]leucine.

Fig. 1 shows the time-dependent loss of radioactivity from intracellular proteins labelled with [^3H]leucine for 5, 15, 30 and 60 min. It is clear that the amount of protein which is degraded at a specific chase-time increases when the pulse-time decreases. This enhanced degradation appears to be due to a faster degradation of the proteins labelled for shorter pulses during the initial chase times, because after

8 h chase the various decay curves appear to run parallel.

Kinetics of protein degradation is first-order and half-life is a convenient way of expressing first-order kinetics. When the experimental values of radioactive decay in short-labelled proteins shown in Fig. 1 were plotted semilogarithmically, in all cases and in good agreement with results described before in other experimental systems, the best fitted regression lines (see correlation coefficients, r^2 , in the inset from Fig. 1 and in Fig. 2a–c), calculated as described in Section 2, were obtained when two first-order kinetics were considered. These two kinetics, are separated by a clear discontinuity which appears more evident at shorter pulse times (Fig. 1). The inset in Fig. 1

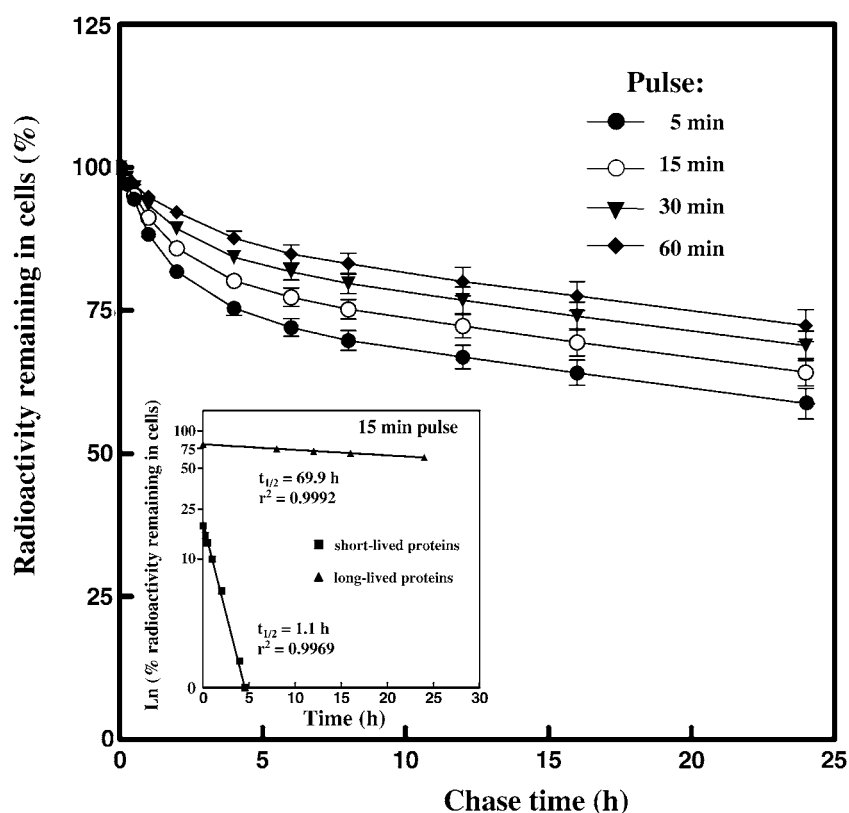


Fig. 1. Kinetics of degradation of short-labelled proteins in human fibroblasts after various pulse times. Human fibroblasts were labelled with [^3H]leucine for 5 (●), 15 (○), 30 (▼) and 60 (◆) min and radioactivity in the cells, at the different chase times, was calculated as described in Section 2 and expressed as percentage of the initial radioactivity. Each point is the mean \pm S.D. of four separate experiments with duplicate samples. The inset shows the two first-order kinetics (i.e. short-lived proteins (■) and long-lived proteins (▲)) which result from the analysis and decomposition of the experimental values of the degradation of proteins in human fibroblasts pulse-labelled for 15 min. The correlation coefficients (r^2) of the regression lines and the calculated half-lives ($t_{1/2}$) are also indicated.

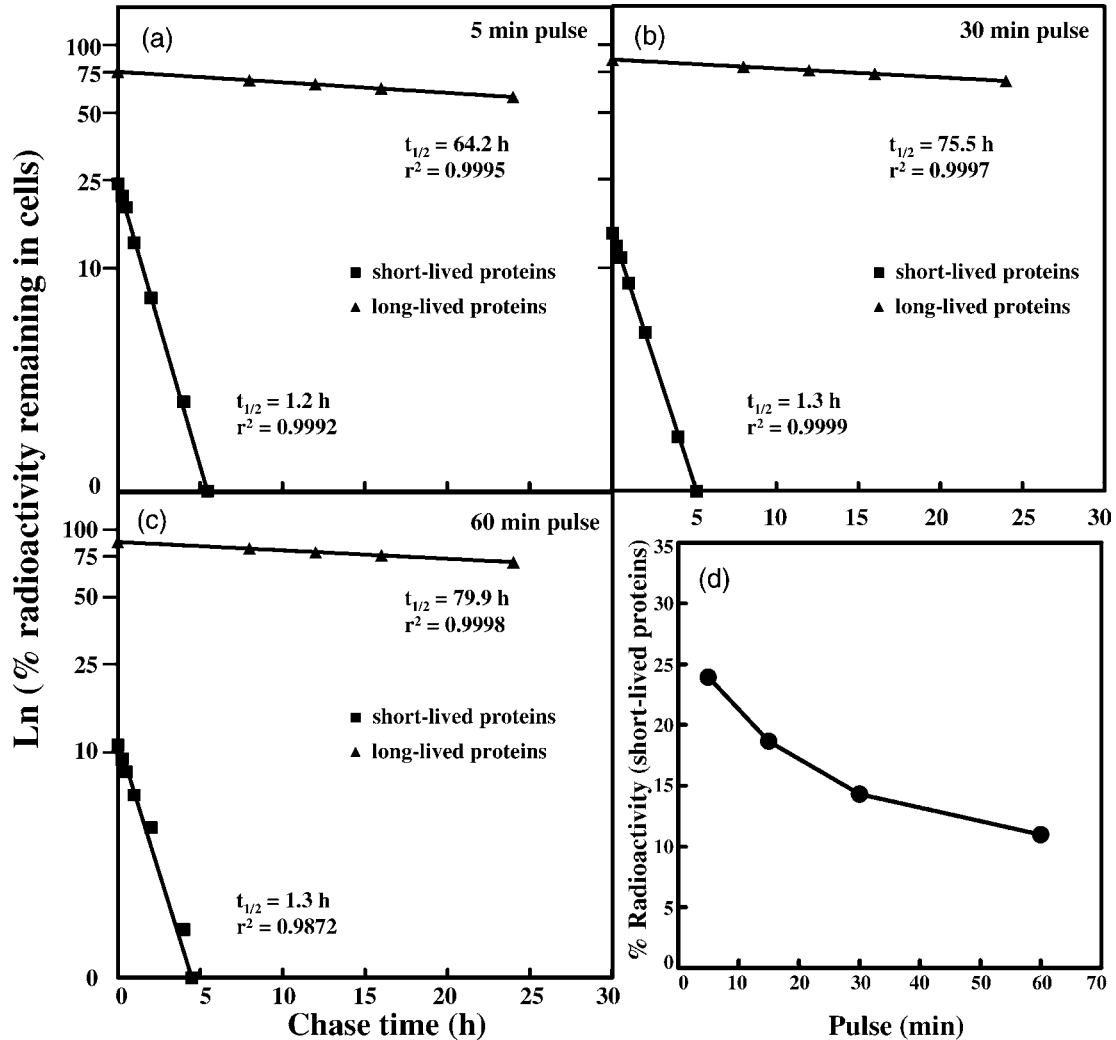


Fig. 2. Degradation kinetics of long- and short-lived proteins in human fibroblasts radiolabelled for various pulse times. Panels a–c show the two first-order kinetics (i.e. short-lived proteins (■) and long-lived proteins (▲)) which result from the analysis and decomposition of the experimental values of the degradation of proteins in human fibroblasts pulse-labelled for 5 min (a), 30 min (b) and 60 min (c). The correlation coefficients (r^2) of the regression lines and the calculated half-lives ($t_{1/2}$) are also indicated. Panel d shows the calculated percentage of the labelled short-lived proteins (n_s) at the various pulse times (see Table 1).

shows these calculations for the 15 min pulse experiments: the experimental curve was decomposed, as described in Section 2, into two exponential functions, one corresponding to slowly renewed proteins (long-lived proteins) and other to rapidly renewed proteins (short-lived proteins), with calculated half-lives of about 69.9 and 1.1 h, respectively. Fig. 2a–c shows the results obtained when the decay curves of the

radioactive proteins labelled for 5, 30 and 60 min, respectively, were similarly analysed. Although the mean half-life of short-lived proteins remained fairly constant (1.1–1.3 h), the mean half-life of the pool of long-lived proteins experimented an increase at longer pulse-times; from 64.2 h (5 min pulse) to 79.9 h (60 min pulse). This indicates that, although the pool of long-lived proteins is composed of many

Table 1

Half-lives ($t_{1/2}$) and relative proportions of radioactivity incorporated (n) and steady-state protein levels (N) of short- (S) and long-lived (L) proteins in exponentially growing human fibroblasts labelled with [^3H]leucine for the indicated pulse times

Pulse time	n_S (%)	$t_{1/2S}$ (h)	N_S (%)	n_L (%)	$t_{1/2L}$ (h)	N_L (%)
5 min	24.3 \pm 1.4	1.2 \pm 0.2	0.61 \pm 0.02	76.1 \pm 0.6	64.2 \pm 3.7	99.39 \pm 0.02
15 min	19.5 \pm 1.9	1.1 \pm 0.2	0.41 \pm 0.02	81.4 \pm 0.7	69.9 \pm 4.2	99.59 \pm 0.02
30 min	14.3 \pm 1.3	1.3 \pm 0.2	0.33 \pm 0.01	85.7 \pm 0.7	75.5 \pm 5.0	99.67 \pm 0.01
1 h	11.7 \pm 1.9	1.3 \pm 0.3	0.27 \pm 0.01	89.0 \pm 0.7	79.9 \pm 5.5	99.73 \pm 0.01

Results are the mean \pm S.D. from four different experiments with duplicate samples and are calculated as described in Section 2. The n -values are calculated separately from the estimated exponential kinetics for short- and long-lived proteins (see Section 2) and, therefore, addition of n_S and n_L for a given pulse time is not exactly 100%. However, the real values should be close to those shown.

proteins with different, but continuous, half-lives (as it is known from the literature), short-lived proteins correspond to proteins which are degraded at quite similar rates. Longer pulse times increase the amount of labelling in the more slowly renewed proteins of the long-lived proteins, which explains the augmented mean half-life of these proteins. However, even after 1 h pulse, there is still a clear separation between short- and long-lived proteins (see Fig. 1), i.e. there is a discontinuity in the degradation rates of these two groups of proteins. Table 1 summarises the analysis of the pools of short- and long-lived proteins at the various pulse-times. It is clear that the relative labelling of both pools of proteins (n_S and n_L values in Table 1) depends on the pulse-time; the amount of labelled short-lived proteins increasing at shorter pulses. This is more evident in Fig. 2d. Although it is experimentally difficult to use pulses shorter than 5 min, extrapolation of the curve shown in Fig. 2d to the ordinate indicates that about 30% of all newly synthesised proteins in human fibroblasts are rapidly degraded. In this regard, it should be also taken into account that measurements of degradation started about 2 min later because after the end of the pulse the cells were washed (see Section 2). Thus, the real values of the radioactivity incorporated into short-lived proteins could be even higher than those calculated here. Finally, the steady state amounts of short- and long-lived proteins (N values in Table 1) change little, although the levels of short-lived proteins slightly decrease with increasing pulse times. This is probably due to the fact that, under these conditions, the stability of the labelled long-lived, but not of the short-lived, proteins increases (see the half-lives of long-lived proteins at the various pulses in Table 1).

3.2. Degradation kinetics of short-labelled proteins in human fibroblasts under various growth conditions

Next, the degradation of proteins labelled for 15 min was followed in exponentially growing and in confluent human fibroblasts with or without serum (Fig. 3). Significant differences in degradation were observed, particularly in serum deprived cells. In confluent cells

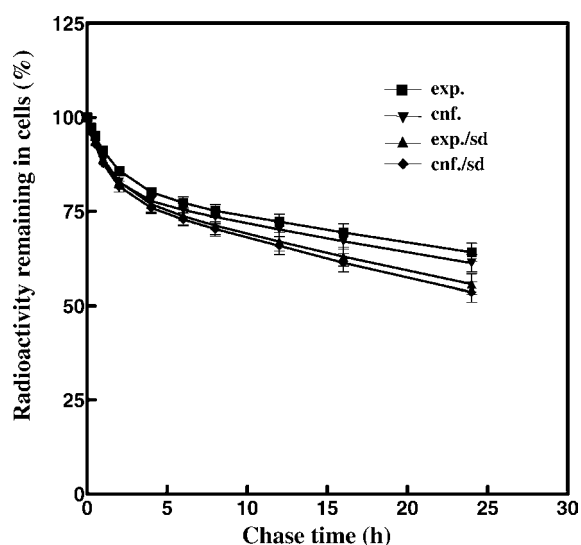


Fig. 3. Kinetics of degradation of short-labelled proteins in human fibroblasts labelled for 15 min and incubated under various growth conditions. Exponentially growing (exp., ■, ▲) or confluent (cnf., ▼, ◆) human fibroblasts were labelled with [^3H]leucine for 15 min and incubated in the presence (■, ▼) or absence (sd, ▲, ◆) of serum. At the different chase times, radioactivity in the cells was calculated as described in Section 2 and expressed as percentage of the initial radioactivity. Each point is the mean \pm S.D. of four separate experiments with duplicate samples.

Table 2

Half-lives ($t_{1/2}$) and relative proportions of radioactivity incorporated (n) and steady-state protein levels (N) of short- (S) and long-lived (L) proteins in human fibroblasts grown as specified and labelled with [^3H]leucine for 15 min

Growth conditions	n_S (%)	$t_{1/2S}$ (h)	N_S (%)	n_L (%)	$t_{1/2L}$ (h)	N_L (%)
Exp.	19.5 ± 1.9	1.1 ± 0.2	0.41 ± 0.02	81.4 ± 0.7	69.9 ± 4.2	99.59 ± 0.02
Exp./sd	19.2 ± 1.4	1.0 ± 0.2	0.56 ± 0.01	81.7 ± 0.6	45.0 ± 3.6	99.44 ± 0.01
Cnf.	21.2 ± 2.3	0.9 ± 0.2	0.42 ± 0.02	81.3 ± 0.8	60.8 ± 4.4	99.58 ± 0.02
Cnf./sd	18.7 ± 2.1	0.8 ± 0.2	0.49 ± 0.02	82.0 ± 0.7	40.9 ± 3.8	99.51 ± 0.02

For details see Table 1. Exp.: exponential; Cnf.: confluent; sd: serum deprivation during the chase times.

with (cnf.) or without (cnf./sd) serum, there is a slight increase in the degradation of short-labelled proteins as compared to exponentially growing fibroblasts with (exp.) or without (exp./sd) serum, respectively. Notice also that here (Fig. 3), and in contrast to Fig. 1, the decay curves after 8 h chase do not appear to run parallel.

When the pools of short- and long-lived proteins, which contribute to the decay curves of the short labelled proteins in the cells, were analysed under the various growth conditions (Table 2), it was found that the relative labelling of both pools of proteins (n values) remained fairly constant. Also, from this analysis it appears that the different degradation kinetics observed with proteins labelled for 15 min and incubated under the different growth conditions (Fig. 3) are mainly due to variations in the half-lives of the pool of long-lived proteins. Although some acceleration of the degradation of short-lived proteins was also noticed, especially under confluent conditions (see Table 2), these differences may derive from the indirect way used to calculate the half-lives of short-lived proteins. In this regard, notice also that the steady state amount of short-lived proteins (N_S in Table 2) slightly increases when the stability of the labelled long-lived proteins decreases, indicating that the stability of short-lived proteins is little or not affected by the growth conditions.

3.3. Contribution of proteasomes and of other proteolytic pathways to the degradation of short-labelled proteins under various growth conditions

Proteasomes are usually considered to be the main proteolytic pathway to degrade short-lived proteins. To confirm this, we analysed the effect of various

inhibitors of proteasomes (lactacystin, *clasto* lactacystin β -lactone and epoxomicin). Since it is known that lysosomes also constitute an important mechanism to degrade proteins, especially in the absence of serum, we also used a combination of NH_4Cl and leupeptin to inhibit all the lysosomal pathways and 3-methyladenine to inhibit the most important lysosomal pathway: macroautophagy. In preliminary experiments, we tested different inhibitors at various concentrations. The inhibitors and concentrations used in the following experiments were selected based on their maximal inhibitory effects on degradation and on their additivity with inhibitors of the other pathway. Also the most appropriate inhibition conditions were established. Thus, we analysed the effects of these inhibitors 1 h after adding them to the medium, to obtain their maximal efficiency, and at various times within a period of three more hours. Longer incubation times were not used to minimise side effects. Interestingly, the inhibition obtained with the proteasomal inhibitors and with leupeptin plus NH_4Cl were fairly additive, indicating that there is very little inhibition of lysosomal pathways by the proteasomal inhibitors and vice versa. Thus, for example, addition of the inhibitions produced individually by *clasto* lactacystin β -lactone and by the combination of leupeptin plus NH_4Cl on the degradation of short-labelled proteins (15 min pulse) in exponentially growing cells with or without serum (see Fig. 4a), yields a total inhibition of 91.7 ± 3.4 and 98.1 ± 4.7 , respectively. When these three inhibitors were combined in exponentially growing cells with or without serum the inhibitions obtained were 86.6 ± 3.2 and 93.5 ± 3.7 , respectively. Also, when 3-methyladenine and leupeptin plus NH_4Cl were used together, the inhibition obtained was the same than that produced with leupeptin plus NH_4Cl alone, indicating that leupeptin plus NH_4Cl inhibit macroautophagy as

well as other lysosomal pathways. Therefore, we calculated directly the contribution of proteasomes and of macroautophagy to the degradation of proteins by using lactacystin, *clasto* lactacystin β -lactone or epoxomicin and 3-methyladenine, respectively. Since quite similar results were obtained with the three proteasomal inhibitors, only results with *clasto* lactacystin β -lactone are shown here. The contribution to the degradation of proteins by other lysosomal pathways (“other lysosomal”) was calculated from the difference in the inhibitions obtained with leupeptin plus NH_4Cl and with 3-methyladenine. Finally, the contribution of other proteolytic pathways, different from proteasomes and lysosomes (“other pathways”), was here defined as the degradation which is insensitive to proteasomal (*clasto* lactacystin β -lactone in Fig. 4) and lysosomal (leupeptin plus NH_4Cl) inhibitors.

Fig. 4 shows the contributions, calculated as above, of the various proteolytic pathways to the degradation of short-labelled (a) and the pool of long-lived proteins (b) in cells labelled with [^3H]leucine for 15 min and growing under various conditions. To calculate these values, we washed the cells at 0 (short-labelled

proteins) and 8 h (long-lived pool of proteins) after the chase, added the inhibitors and analysed their effects 1 h later and at various times within a period of 3 more hours (i.e. within 1–4 and 9–12 h chase, respectively). Under exponential growth, with or without serum, proteasomes are responsible of 55–60% of the degradation of short-labelled (Fig. 4a) and long-lived proteins (Fig. 4b). The remaining degradation is due to lysosomes (especially under serum deprivation, where there is increased macroautophagy particularly when analysing long-lived proteins) and to other non-proteasomal and non lysosomal pathways. However, the importance of these latter pathways appears to decrease strongly under serum deprivation. Under confluent conditions, the contribution of proteasomes to the degradation of short-labelled proteins decreases slightly (40–50%), especially in cells incubated without serum. Under the same conditions, the contribution by lysosomes to protein degradation increases to reach almost 50% in the absence of serum, while the non-proteasomal and non-lysosomal pathways are responsible of less than 20% of the total degradation. The activity of these pathways decreases again in

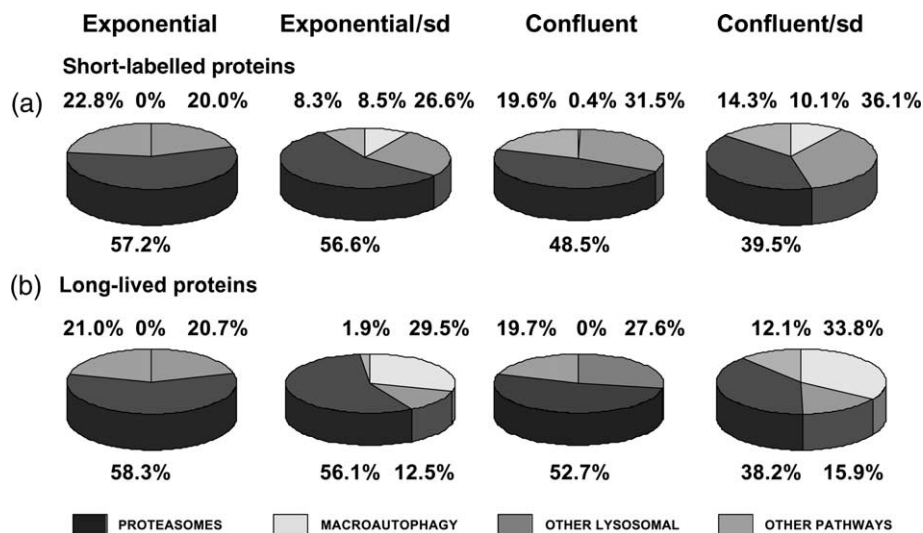


Fig. 4. Contribution of proteasomes and of other proteolytic pathways to the degradation of short-labelled (a) and long-lived proteins (b) in human fibroblasts radiolabelled for 15 min and incubated under various growth conditions. The contribution of the various proteolytic pathways (proteasomes, macroautophagy and of other lysosomal and non-lysosomal pathways) to the degradation of short-labelled (a) and long-lived (b) proteins in exponentially growing and confluent fibroblasts, incubated with or without (sd), serum was calculated, as described in the text, using *clasto* lactacystin β -lactone to inhibit proteasomes, 3-methyladenine to inhibit macroautophagy and NH_4Cl plus leupeptin to inhibit macroautophagy and the other lysosomal pathways. Results are shown as percentage of inhibition. Each value is the mean of at least four separate experiments with duplicate or triplicate samples.

the absence of serum but to a lower extent than in exponentially growing cells.

3.4. Contribution of proteasomes and of other proteolytic pathways to the degradation of truly short-lived proteins under various growth conditions

The degradation of short-labelled proteins is a composite of the degradation of long-lived proteins and of truly short-lived proteins (Table 2). Therefore, to estimate the contribution of the various proteolytic pathways to the degradation of truly short-lived proteins, the amount of short-labelled and of long-lived proteins which are degraded by the various proteolytic pathways in the 3 h period here analysed were calculated from the data shown in Figs. 3 and 4 and in

Table 2. By subtracting these values the amount of truly short-lived proteins which are degraded by the various pathways was obtained (Fig. 5a). This allows to calculate the percentage of contribution of the various pathways to the degradation of truly short-lived proteins under the various growth conditions (Fig. 5b). It can be seen that proteasomes contribute to about 55–60% of the degradation of truly short-lived proteins under exponential growth and to 40–50% under confluent conditions. It appears also that there is no detectable degradation of short-lived proteins by macroautophagy, even under serum deprivation and that the inhibitory effect of 3-methyladenine on the degradation of short-labelled proteins (Fig. 4a) can be fully explained by its effect on the degradation of the pool of long-lived proteins (Fig. 4b). The contribution of non-macroautophagic lysosomal pathways

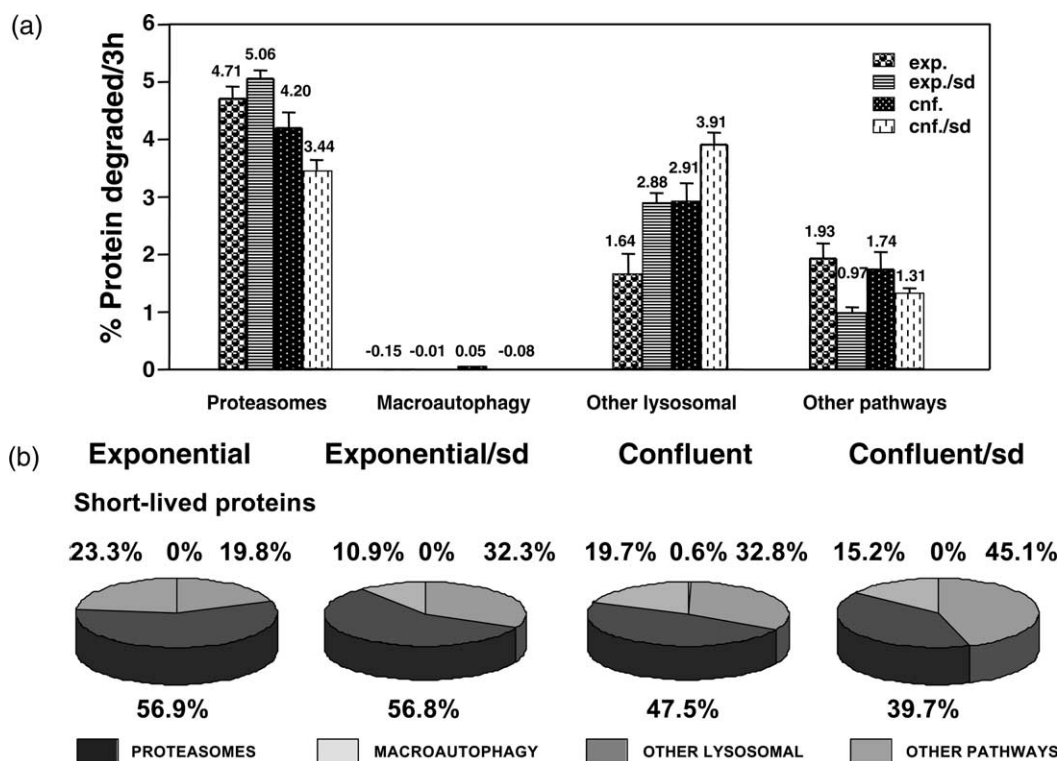


Fig. 5. Contribution of proteasomes and of other proteolytic pathways to the degradation of truly short-lived proteins in human fibroblasts radiolabelled for 15 min under various growth conditions. The contribution of the various proteolytic pathways (proteasomes, macroautophagy, other lysosomal pathways and other non-proteasomal and non-lysosomal pathways) was calculated as described in the text. Data are shown either as percentage of the labelled protein which degradation is inhibited in 3 h (a) or as percentage of inhibition (b). S.D. are also shown in part a.

increases under serum deprivation and even more under confluent conditions. This increase in the activity of the non-macroautophagic lysosomal pathways in confluent cells is concomitant to the observed decrease in the contribution of proteasomes under these conditions (Fig. 5b). Finally, other non-proteasomal and non-lysosomal pathways contribute only to about 20% (in the presence of serum) and to 10–15% (in the absence of serum) of the degradation of truly short-lived proteins. These values should be even lower because they include the protein released to the medium (see Section 4).

4. Discussion

In the present work, we have analysed the contribution of various proteolytic pathways to the degradation of truly short-lived proteins in human fibroblasts under various growth conditions. To this end, we have taken advantage of mathematical procedures developed before (Knecht et al., 1980; Wheatley et al., 1982; Corella et al., 1998) to investigate separately, in human fibroblasts, the degradation of the fractions of long- and short-lived proteins which compose the short-labelled proteins. These two protein fractions are degraded together, but their degradation kinetics are clearly separated by a discontinuity (see Fig. 1) which allows to identify them unambiguously. Figs. 1 and 2 and Table 1 indicate that truly short-lived proteins are degraded, independently of the pulse time, with a half-life of approximately 1 h and that, although they only represent less than 1% of the existing protein under steady state conditions, they contribute to a large proportion (about 30% or more) of the degradation which occurs in human fibroblasts (see Fig. 2d). This is in accordance with previous views (see below).

The nature of these short-lived proteins has been matter of speculation. Since no discontinuity exists in the half-lives of the different cellular proteins, it is unlikely that these short-lived proteins only represent a group of proteins synthesised in large amounts but with half-lives around 1 h (i.e. certain transcription factors or regulatory enzymes) clearly separated from the half-lives of the remaining cell proteins. Moreover, we have confirmed the results from Wheatley et al. (1980) showing that there are no apparent differences in the electrophoretic (SDS-PAGE) pattern of short-labelled

and long-lived proteins (data not shown). In addition, we have also found, in other cell type, that the mean molecular size of short-labelled proteins is lower than that of long-lived proteins, as judged by gel filtration, and also that short-labelled proteins are in vitro more susceptible to proteases than long-lived proteins (Aniento, Roche, & Knecht, unpublished observations). This makes it possible that the fraction of short-lived proteins here analysed represents newly synthesised proteins which are rapidly degraded, as firstly suggested by Wheatley et al. (1980). In this regard, in the last years it has become evident that a large proportion (more than 30%, see Kloetzel, 2001) of nascent proteins do not reach their cellular localisation but instead are recognised and rapidly degraded by the ubiquitin–proteasome system. These proteins, most of which are probably non-functional due to errors in translation and/or post-translational folding (Turner & Varshavsky, 2000), have been called defective ribosomal products or DRIPs (Schubert et al., 2000). In addition, it has been pointed out that this extensive degradation in the cytosol could represent an important source of antigenic peptides for presentation by the class I major histocompatibility complex (Reits, Vos, Grommé, & Neefjes, 2000; Schubert et al., 2000). Thus, most probably, the short-lived proteins studied here mainly correspond to DRIPs.

We have also analysed the degradation of short-labelled proteins under various growth conditions (Fig. 3 and Table 2). There is increased degradation of these proteins under confluent conditions and serum deprivation. However, it appears that these variations mainly, if not exclusively, affect long-lived proteins.

Once characterised the pool of truly short lived proteins in human fibroblasts under the various growth conditions, we have taken advantage of the availability of specific inhibitors of the various proteolytic pathways. Lactacystin (Fenteany et al., 1995) is spontaneously converted in the extracellular medium into cell-permeant clasto lactacystin β -lactone (Dick et al., 1996; Craiu et al., 1997). Although lactacystin is considered a more specific proteasomal inhibitor than others (*N*-acetyl-leucinal-leucinal-norleucinal, MG132, etc.), it is also known to interfere with lysosomal cathepsin A (Ostrowska et al., 2000). However, since we observe fairly additive effects of clasto lactacystin β -lactone with the lysosomal inhibitors, the quantitative contribution of cathepsin A to the

turnover of short-labelled proteins should be low. Similar results to those obtained with lactacystin were observed when clasto lactacystin β -lactone was directly used and with other proteasomal inhibitor, epoxomicin (Meng et al., 1999).

In our studies, different combinations of proteasomal and lysosomal inhibitors were unable to fully suppress the degradation of short-labelled proteins under any growth condition. Although this apparent degradation was fully attributed here to other non-lysosomal and non-proteasomal pathways, it should be noticed that part of it reflects the release by the cells of trichloroacetic acid-insoluble proteins to the medium. This release represents 5–7.5% of the initial trichloroacetic acid-insoluble radioactivity of short-labelled proteins in the 1–4 h chase period analysed and is most likely due to protein secretion and not to cell death, because >98% of cells were alive at the end of the 4 h chase and also because this release decreases to about 1/10th of the above values when the inhibition experiments were performed after 8 h of chase. In addition, it is also possible that at least some of the inhibitors used are unable to fully inhibit all the activity of their respective affected pathways (see, for example, Tournu et al., 2001). However, and conversely, it is also possible that some of these inhibitors also affect non-lysosomal and non-proteasomal pathways of protein degradation. Thus, the real contribution of these pathways (which should include cytosolic and organellar proteases) to the degradation of truly short-lived proteins would require further studies with specific inhibitors of these various proteases. In any case, and taking into account the results obtained here and the above considerations, the role of these non-proteasomal and non-lysosomal proteases in the overall protein turnover of short-lived proteins appears to be rather low.

By analysing the effects of proteasomal and lysosomal inhibitors on the degradation of short-labelled proteins and the fraction of labelled long-lived proteins (Fig. 4), it was possible to investigate the role of the various proteolytic pathways in the degradation of the fraction of truly short-lived proteins (Fig. 5). According to these results, proteasomes are important in the degradation of short-lived proteins, but they degrade, at most, 60% of these proteins in human fibroblasts. Macroautophagy does not appear to be involved in the degradation of short-lived proteins under our

conditions. In this regard we used in most of our experiments [^3H]leucine in the pulse and 2 mM leucine in the chase and leucine is known to be an inhibitor of macroautophagy in cultured hepatocytes (Seglen, Gordon, & Poli, 1980) and in liver (Pösö, Wert, & Mortimore, 1982). However, no differences were found when the effects of 3-methyladenine were analysed in cells labelled with [^3H]valine and chased with 10 mM valine. Since all our experiments were carried out in the presence of amino acids (see Section 2) it is possible that addition of 2 mM leucine does not inhibit further. Alternatively, it is also possible that leucine is less effective as an inhibitor of macroautophagy in human fibroblasts.

Lysosomal pathways different from macroautophagy are clearly implicated in the degradation of short-lived proteins under all growth conditions. The importance of the lysosomal activity in the degradation of short-lived proteins is supported by our finding that in confluent cells and in the absence of serum, NH_4Cl plus leupeptin inhibit the degradation of these proteins even more efficiently than the proteasomal inhibitors (see Fig. 5b, confluent/sd). It may appear at first surprising that lysosomes could be responsible for such an important proportion of the proteolysis of short-lived proteins even in exponentially growing cells. However, there are some examples of specific short-lived proteins which are degraded by lysosomes. Thus, BRCA1, a tumour suppressor protein which is degraded with a half-life of about 2 h, has been found in several cell lines to be degraded by lysosomes but not by proteasomes and calpains (Blagosklonny et al., 1999). In addition, it seems possible that the relative importance of proteasomes and of lysosomes in overall protein degradation, including the degradation of short-lived proteins, varies in different cell types and conditions. Thus, it has been shown with hepatocytes in a state of negative protein balance that more than 50% of the short-labelled (1 h pulse) proteins are degraded by lysosomes (Schwarze & Seglen, 1983).

In conclusion, both proteasomes and lysosomes contribute to 80% or more of the degradation of short-lived proteins in normal human fibroblasts. Therefore, if these short-lived proteins mainly correspond to DRIPs, as it appears, this degradation represents a protein quality control which degrades polypeptides that fail to attain their native structure, thus preventing toxic protein aggregation events (Ma

& Hendershot, 2001; Wickner, Maurizi, & Gottesman, 1999). Since the pathology of certain diseases, such as Alzheimer's, Parkinson's and others, is associated to failure in these degradation processes (Slavotinek & Biesecker, 2001), it is clear that not only proteasomes (Bence, Sampat, & Kopito, 2001) but also lysosomes are involved in these pathologies. Moreover, if the products of the degradation of DRIPs represent a source of antigenic peptides (Kloetzel, 2001; Reits et al., 2000; Schubert et al., 2000) and if the results obtained here with lysosomes also apply to the cells which express class II major histocompatibility complexes on their surfaces, then these intracellular antigens may also be presented by this class of major histocompatibility complexes.

Acknowledgements

This work was supported by the Ministerio de Ciencia y Tecnología (grants BMC2001-0816 and SAF2002-00206) and by the Generalitat Valenciana (grant CTIDIB/2002/86). We thank A. Montaner and D. Cerveró for technical assistance.

References

- Abeliovich, H., & Klionsky, D. J. (2001). Autophagy in yeast: Mechanistic insights and physiological function. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65, 463–479.
- Attaix, D., Combaret, L., Pouch, M. N., & Taillandier, D. (2001). Regulation of proteolysis. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 4, 35–37.
- Bence, N. F., Sampat, R. M., & Kopito, R. R. (2001). Impairment of the ubiquitin–proteasome system by protein aggregation. *Science*, 292, 1552–1555.
- Blagosklonny, M. V., An, W. G., Melillo, G., Nguyen, P., Trepel, J. B., & Neckers, L. M. (1999). Regulation of BRCA1 by protein degradation. *Oncogene*, 18, 6460–6468.
- Ciechanover, A., Orian, A., & Schwartz, A. L. (2000). Ubiquitin-mediated proteolysis: Biological regulation via destruction. *Bioessays*, 22, 442–451.
- Corella, D., Guillén, M., Hernández, J. M., & Hernández-Yago, J. (1998). Effects of polyamine levels on the degradation of short-lived and long-lived proteins in cultured L-132 human lung cells. *Biochem. J.*, 334, 367–375.
- Craiu, A., Gaczynska, M., Akopian, T., Gramm, C. F., Fenteany, G., Goldberg, A. L., & Rock, K. L. (1997). Lactacystin and clasto-lactacystin β -lactone modify multiple proteasome β -subunits and inhibit intracellular protein degradation and major histocompatibility complex class I antigen presentation. *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 13437–13445.
- Cuervo, A. M., & Dice, J. F. (1998). Lysosomes, a meeting point of proteins, chaperones, and proteases. *Journal of Molecular Medicine*, 76, 1–12.
- Dick, L. R., Cruikshank, A. A., Grenier, L., Melandri, F. D., Nunes, S. L., & Stein, R. L. (1996). Mechanistic studies on the inactivation of the proteasome by lactacystin. A central role for clasto-lactacystin β -lactone. *The Journal of Biological Chemistry*, 271, 7273–7276.
- Fenteany, G., Standaert, R. F., Lane, W. S., Choi, S., Corey, E. J., & Schreiber, S. L. (1995). Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. *Science*, 268, 726–731.
- Gandre, S., & Kahana, C. (2002). Degradation of ornithine decarboxylase in *Saccharomyces cerevisiae* is ubiquitin independent. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 293, 139–144.
- Glading, A., Lauffenburger, D. A., & Wells, A. (2002). Cutting to the chase: Calpain proteases in cell motility. *Trends in Cell Biology*, 12, 46–54.
- Glickman, M. H., & Ciechanover, A. (2002). The ubiquitin–proteasome proteolytic pathway: Destruction for the sake of construction. *Physiological Reviews*, 82, 373–428.
- Goldberg, A. L., & Dice, J. F. (1974). Intracellular protein degradation in mammalian and bacterial cells. *Annual Review of Biochemistry*, 43, 835–869.
- Hershko, A., & Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annual Review of Biochemistry*, 67, 425–479.
- Hilt, W., & Wolf, D. H. (Eds.), 2000. *Proteasomes: The World of Regulatory Proteolysis* (pp. 1–391). Georgetown, TX: Landes Bioscience.
- Klionsky, D. J., & Emr, S. D. (2000). Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science*, 290, 1717–1721.
- Kloetzel, P. -M. (2001). Antigen processing by the proteasome. *Nature Reviews in Molecular and Cellular Biology*, 2, 179–187.
- Knecht, E., & Rivett, A. J., 2000. Intracellular localization of proteasomes. In: W. Hilt, D. H. Wolf (Eds.), *Proteasomes: The world of regulatory proteolysis* (pp. 176–185). Georgetown, TX: Landes Bioscience.
- Knecht, E., Hernández-Yago, J., & Grisolia, S. (1984). Regulation of lysosomal autophagy in transformed and non-transformed mouse fibroblasts under several growth conditions. *Experimental Cell Research*, 154, 224–232.
- Knecht, E., Hernández-Yago, J., Martínez-Ramón, A., & Grisolia, S. (1980). Fate of proteins synthesized in mitochondria of cultured mammalian cells revealed by electron microscopic radioautography. *Experimental Cell Research*, 125, 191–199.
- Knecht, E., Martín de Llano, J. J., Andreu, E. J., & Moreno Miralles, I. (1998). Pathways for the degradation of intracellular proteins within lysosomes in higher eukaryotes. In E. E. Bittar, A. J. Rivett (Eds.), *Advances in molecular and cell biology. Intracellular protein degradation* (Vol. 27, pp. 201–234). Stamford, CT: Jai Press Inc.
- Kruger, E., Kloetzel, P. -M., & Enenkel, C. (2001). 20S proteasome biogenesis. *Biochimie*, 83, 289–293.
- Laney, J. D., & Hochstrasser, M. (1999). Substrate targeting in the ubiquitin system. *Cell*, 97, 427–430.
- Langer, T., Käser, M., Klanner, C., & Leonhard, K. (2001). AAA proteases of mitochondria: Quality control of membrane

- proteins and regulatory functions during mitochondrial biogenesis. *Biochemical Society Transactions*, 29, 431–436.
- Lee, D. H., & Goldberg, A. L. (1996). Selective inhibitors of the proteasome-dependent and vacuolar pathways of protein degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 271, 27280–27284.
- Ma, Y., & Hendershot, L. M. (2001). The unfolding tale of the unfolded protein response. *Cell*, 107, 827–830.
- Mayer, R. J. (2000). The meteoric rise of regulated intracellular proteolysis. *Nature Reviews in Molecular and Cellular Biology*, 1, 145–148.
- Meng, L., Mohan, R., Kwok, B. H. B., Elofsson, M., Sin, N., & Crews, C. M. (1999). Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits in vivo anti-inflammatory activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 10403–10408.
- Murakami, Y., Matsufuji, S., Kameji, T., Hayashi, S., Igarashi, K., Tamura, T., Tanaka, K., & Ichihara, A. (1992). Ornithine decarboxylase is degraded by the 26S proteasome without ubiquitination. *Nature*, 360, 597–599.
- Ohsumi, Y. (2001). Molecular dissection of autophagy: Two ubiquitin-like systems. *Nature Reviews in Molecular and Cellular Biology*, 2, 211–216.
- Ostrowska, H., Wójcik, C., Wilk, S., Omura, S., Kozłowski, L., Stokłosa, T., Worowski, K., & Radziwon, P. (2000). Separation of cathepsin A-like enzyme and the proteasome: Evidence that lactacystin/beta-lactone is not a specific inhibitor of the proteasome. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 32, 747–757.
- Perrin, B. J., & Huttenlocher, A. (2002). Calpain. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 34, 722–725.
- Pickart, C. M. (2001). Mechanisms underlying ubiquitination. *Annual Review of Biochemistry*, 70, 503–533.
- Pillay, C. S., Elliott, E., & Dennison, C. (2002). Endolysosomal proteolysis and its regulation. *The Biochemical Journal*, 363, 417–429.
- Pine, M. J. (1972). Turnover of intracellular proteins. *Annual Review of Microbiology*, 26, 103–126.
- Poole, B., & Wibo, M. (1973). Protein degradation in cultured cells. The effect of fresh medium, fluoride and iodoacetate on the digestion of cellular protein of rat fibroblasts. *The Journal of Biological Chemistry*, 248, 6221–6226.
- Pösö, A. R., Wert Jr., J. J., & Mortimore, G. E. (1982). Multifunctional control by amino acids of deprivation-induced proteolysis in liver. Role of leucine. *The Journal of Biological Chemistry*, 257, 12114–12120.
- Reits, E. A. J., Vos, J. C., Grommé, M., & Neefjes, J. (2000). The major substrates for TAP in vivo are derived from newly synthesized proteins. *Nature*, 404, 774–778.
- Rivett, A. J. (1998). Intracellular distribution of proteasomes. *Current Opinion in Immunology*, 10, 110–114.
- Rock, K. L., Gramm, C., Rothstein, L., Clark, K., Stein, R., Dick, L., Hwang, D., & Goldberg, A. L. (1994). Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell*, 78, 761–771.
- Salvador, N., Aguado, C., Horst, M., & Knecht, E. (2000). Import of a cytosolic protein into lysosomes by chaperone-mediated autophagy depends on its folding state. *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 27447–27456.
- Schubert, U., Antón, L. C., Gibbs, J., Norbury, C. C., Yewdell, J. W., & Bannink, J. R. (2000). Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature*, 404, 770–774.
- Schwarze, P. E., & Seglen, P. O. (1983). Paradoxical stimulation by amino acids of the degradation of [³⁵S] methionine-labelled, short-lived protein in isolated rat hepatocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 117, 509–516.
- Seglen, P. O., Gordon, P. B., & Poli, A. (1980). Amino acid inhibition of the autophagic/lysosomal pathway of protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 693, 103–118.
- Slavotinek, A. M., & Biesecker, L. G. (2001). Unfolding the role of chaperones and chaperonins in human disease. *Trends in Genetics*, 17, 528–535.
- Tournu, C., Obled, A., Roux, M. -P., Ferrara, M., Omura, S., & Béchet, D. M. (2001). Glucose regulates protein catabolism in *ras* transformed fibroblasts through a lysosomal-dependent proteolytic pathway. *The Biochemical Journal*, 357, 255–261.
- Turner, G. C., & Varshavsky, A. (2000). Detecting and measuring cotranslational protein degradation in vivo. *Science*, 289, 2117–2120.
- Vargas, J. L., Aniento, F., Cervera, J., & Knecht, E. (1989). Vanadate inhibits degradation of short-lived, but not of long-lived, proteins in L-132 human cells. *The Biochemical Journal*, 258, 33–40.
- Wheatley, D. N., Giddings, M. R., & Inglis, M. S. (1980). Kinetics of degradation of 'short-' and 'long-lived' proteins in cultured mammalian cells. *Cell Biology: International Reports*, 4, 1081–1090.
- Wheatley, D. N., Grisolia, S., & Hernández-Yago, J. (1982). Significance of the rapid degradation of newly synthesized proteins in mammalian cells: A working hypothesis. *Journal of Theoretical Biology*, 98, 283–300.
- Wickner, S., Maurizi, M. R., & Gottesman, S. (1999). Posttranslational quality control: Folding, refolding, and degrading proteins. *Science*, 286, 1888–1893.

Changes in the proteolytic activities of proteasomes and lysosomes in human fibroblasts produced by serum withdrawal, amino-acid deprivation and confluent conditions

Graciela FUERTES*, José Javier MARTÍN DE LLANO*, Adoración VILLARROYA*, A. Jennifer RIVETT† and Erwin KNECHT*¹

*Instituto de Investigaciones Citológicas, Fundación Valenciana de Investigaciones Biomédicas, Amadeo de Saboya 4, 46010-Valencia, Spain, and †Department of Biochemistry, School of Medical Sciences, University of Bristol, Bristol BS8 1TD, U.K.

The contribution of the main proteolytic pathways to the degradation of long-lived proteins in human fibroblasts grown under different conditions was investigated. The effects of various commonly used pharmacological inhibitors of protein degradation were first analysed in detail. By choosing specific inhibitors of lysosomes and proteasomes, it was observed that together both pathways accounted for 80% or more of the degradation of cell proteins. With lysosomal inhibitors, it was found that serum withdrawal or amino-acid deprivation strongly stimulated macroautophagy but not other lysosomal pathways, whereas confluent conditions had no effect on macroautophagy and slightly activated other lysosomal pathways. Prolonged (24 h) serum starvation of confluent cultures strongly decreased the macroautophagic pathway, whereas the activity of other lysosomal pathways increased. These changes correlated with electron microscopic observations and morphometric measurements of lysosomes. With proteasomal inhibitors, it was found that, in exponentially growing cells in the

absence of serum, activity of the ubiquitin–proteasome pathway increases, whereas under confluent conditions the contribution (in percentage) of proteasomes to degradation decreases, especially in cells deprived of amino acids. Interestingly, in confluent cells, the levels of two components of the 19 S regulatory complex and those of an interchangeable β -subunit decreased. This was associated with a marked increase in the levels of components of PA28-immunoproteasomes. Thus confluent conditions affect proteasomes in a way that resembles treatment with interferon- γ . Altogether, these results show that the activity of the various proteolytic pathways depends on the growth conditions of cells and will be useful for investigation of the specific signals that control their activity.

Key words: lysosome, macroautophagy, protease, proteasome, proteolysis.

INTRODUCTION

In both prokaryotic and eukaryotic cells, proteins are in a dynamic equilibrium in which degradation is potentially as important as protein synthesis in the control of protein mass. There are various proteases involved in the intracellular degradation of proteins, but proteasomes [1] and lysosomes [2] represent the main proteolytic pathways in mammalian and in other eukaryotic cells. Previous studies investigated the relative importance of lysosomal and non-lysosomal pathways of intracellular protein degradation in different cell types simply by inhibiting lysosomal degradation with weak bases (NH₄Cl, chloroquine, etc.) and/or inhibitors of lysosomal cathepsin [*trans*-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino)butane cell-permeant derivatives, leupeptin, etc.; see e.g. [3–5] for reviews], and it was assumed that the portion of intracellular proteins whose degradation remained resistant to these inhibitors was degraded by non-lysosomal pathways. On the basis of these studies, it was generally believed that in most mammalian cells growing under optimal nutrient conditions degradation of intracellular proteins occurred mainly by non-lysosomal proteolysis, whereas lysosomal degradation became important only in the enhanced degradation of intracellular proteins produced by starvation or deprivation of certain hormones and nutrients.

More recently, a substantial body of experiments firmly established the ubiquitin–proteasome system as the major non-

lysosomal pathway for the degradation of intracellular proteins in eukaryotic cells (see [6] for a recent review). In this pathway, proteins are targeted for destruction by the assembly, on surface-exposed lysine residues, of a polyubiquitin degradation signal that is subsequently recognized by one or more subunits of the 19 S regulatory complex within the 26 S proteasome [7]. In addition, proteasomes, which exist in several different molecular forms, can degrade proteins by ubiquitin-independent mechanisms [8,9]. Although proteasomes have also been reported to function in the degradation of most of the long-lived proteins [10,11], many of the studies on these proteolytic complexes have focused on their regulated degradation of misfolded, abnormal and specific short-lived proteins [6,12,13].

Another well-established pathway of intracellular protein degradation involves segregating structures which sequester large areas of cytoplasm, typically including whole organelles, to form autophagic vacuoles which fuse with lysosomes or late endosomes to degrade its content [14,15]. This lysosomal process, called (classical) autophagy or macroautophagy, has been studied extensively in the last few years, mainly due to the availability of yeast mutants [16,17]. But, in addition to macroautophagy, it has become evident that lysosomes can also participate in intracellular protein degradation by other mechanisms, including endocytosis, crinophagy, microautophagy and chaperone-mediated autophagy (see e.g. [18,19] for reviews). Finally, other non-lysosomal and non-proteasomal proteolytic pathways operate in the cells,

Abbreviations used: ALLM, *N*-acetyl-Leu-Leu-Met-al; ALLN, *N*-acetyl-Leu-Leu-Norleu-al; FCS, foetal calf serum; 3-MA, 3-methyladenine; MEM, minimal essential medium; Z, benzyloxycarbonyl; MG132, Z-Leu-Leu-Leu-H (aldehyde); MG262, Z-Leu-Leu-Leu-B(OH)₂; PI3K, phosphoinositide 3'-kinase; SW, serum withdrawal; Y, 20 S proteasome β 1-subunit.

¹ To whom correspondence should be addressed (e-mail knecht@ochoa.fib.es).

including soluble proteases such as calpains [20] and proteases associated with particular organelles (e.g. mitochondria [21]). However, compared with macroautophagy, much less is known concerning the relative importance of these other lysosomal and non-lysosomal pathways in the overall degradation of intracellular proteins.

Examining the contribution of the different cellular proteolytic pathways to the degradation of the various intracellular proteins in intact cells should help to increase the knowledge about their various functions. The availability of pharmacological inhibitors of proteasomes [22], together with the use of the well-established macroautophagic inhibitor 3-MA (3-methyladenine) [23] in combination with other amply used lysosomal inhibitors [5], allows an analysis of the role of the different proteolytic pathways under various situations. In particular, it is now possible to investigate separately the contributions of macroautophagy, other lysosomal pathways, proteasomes and other non-lysosomal and non-proteasomal pathways to the degradation of intracellular proteins. In a previous study [24], we investigated the effect of some of these inhibitors on the degradation of short-lived proteins. However, the effects of the various inhibitors now available have not been systematically analysed either in that study or in any of the studies conducted so far. Such an analysis will be quite useful, since it may provide a guide for the rational use of inhibitors of the various proteolytic pathways when investigating their role in the breakdown of specific proteins or in other cellular processes in response to various physiological and pathological situations.

The objective of the present study has been to assess the relative importance of macroautophagy, other lysosomal pathways, proteasomes and other non-lysosomal and non-proteasomal pathways in the overall degradation of intracellular proteins in human fibroblasts under various growth conditions. Since long-lived proteins represent the vast majority of proteins in the cell, we analysed here the degradation of these proteins. Among other observations, we found that some still widely used proteasome inhibitors also inhibit lysosomal pathways with the same efficiency. Surprisingly, we also found that the proteasomal activity increases in exponentially growing cell cultures deprived of serum and/or amino acids, that confluent conditions decrease the activity of proteasomes by affecting the levels of various proteasomal subunits, and that lysosomal pathways different from macroautophagy are more important in protein degradation than is usually recognized, especially under confluent conditions.

EXPERIMENTAL

Reagents

Sources of chemicals were as described previously [24] with the following additions: the aldehyde Z-Leu-Leu-Leu-H (referred to as MG132 hereafter; Z represents benzyloxycarbonyl) was obtained from Peptide Institute (Osaka, Japan); Z-Leu-Leu-Leu-B(OH)₂ (referred to as MG262 hereafter) was obtained from Affiniti (Exeter, Devon, U.K.); pepstatin A, wortmannin, concanamycin A, chloroquine, bafilomycin A1, N-acetyl-Leu-Leu-Met-al (ALLM) and N-acetyl-Leu-Leu-Norleu-al (ALLN) were from Sigma (St. Louis, MO, U.S.A.). MG132 was also purchased from Affiniti.

Various antibodies for proteasomes used in the Western-blot analysis of cell fractions have been described previously [25]. They include: (i) four mouse monoclonal antibodies, which recognize, respectively, the α -subunits C8 and C9 of the 20 S proteasome, the subunit p45 of the 19 S regulatory complex and the inducible β -subunit LMP2 of immunoproteasomes, and (ii) two rabbit polyclonal antibodies raised against subunit S3

of the 19 S regulatory complex and the PA28 β subunit of the PA28 (11 S) regulatory complex respectively. In addition, a mouse monoclonal antibody raised against 20 S proteasome β 1-subunit (Y) was purchased from Affiniti. Rabbit polyclonal and mouse monoclonal (clone FK2) antibodies to ubiquitylated proteins were a gift from A. Hershko (Technion-Israel Institute of Technology, Haifa, Israel) or purchased from Affiniti (clone FK2) respectively. The secondary antibodies were anti-mouse and anti-rabbit IgG-alkaline phosphatase from goat (Sigma). Other reagents were of the best analytical quality available.

Cell culture and intracellular protein degradation of long-lived proteins

Normal human skin fibroblasts were obtained and cultured as described previously [24]. Cell viability, checked by Trypan Blue exclusion, was always above 95 % at the end of incubations. To label long-lived proteins, fibroblasts were incubated for 48 h in complete MEM (minimal essential medium; Gibco Invitrogen Corporation, Prat de Llobregat, Barcelona, Spain) containing 20 % (v/v) FCS (foetal calf serum) and with 5 μ Ci/ml L-[³H]leucine or 5 μ Ci/ml L-[³H]valine. Before starting the proteolysis measurements, the cells were washed once with complete MEM, containing 2 mM L-leucine or 10 mM L-valine, and chased for 24 h at 37 °C in this medium to degrade short-lived proteins. For prolonged starvation, the cells were washed and chased as above but in a medium without FCS. To measure protein degradation, all cultures were incubated in a fresh complete medium containing 2 mM L-leucine or 10 mM L-valine with or without [under serum withdrawal (SW) conditions] 20 % FCS and the indicated additions. For experiments of amino-acid deprivation, labelling and washing of the cells were performed as above, but using only L-[³H]valine and 10 mM L-valine. To measure protein degradation under amino-acid deprivation, the cells were incubated in Krebs-Henseleit medium (118.4 mM NaCl/4.75 mM KCl/1.19 mM KH₂PO₄/2.54 mM MgSO₄/2.44 mM CaCl₂ · 2H₂O/28.5 mM NaHCO₃/10 mM glucose, pH 7.4) containing 10 mM L-valine with or without (under SW) 20 % FCS, and the indicated additions. Preliminary experiments suggested the convenience of analysing protein degradation 1 h after the addition of the different inhibitors used in the present study and for a period of only 3 additional hours. This ensures optimal inhibition and should avoid possible secondary effects of the drugs, which may compromise cell viability.

Intracellular protein degradation was measured as the net release of trichloroacetic acid-soluble radioactivity from the labelled cells into culture medium, as described in [24]. Radioactivity released in the non-soluble trichloroacetic acid fraction of the medium was negligible (at all the experimental times it was always 0.3 % h⁻¹ of the initial non-soluble trichloroacetic acid radioactivity). Proteolytic rates were calculated by least-squares regression of semi-logarithmic plots.

Electron microscopy and morphometric analysis

Cells were washed with ice-cold PBS and fixed for 15 min in the dishes by direct addition of a mixture of 2 % (v/v) glutaraldehyde and 1 % formaldehyde (EM grade; Polysciences, Warrington, PA, U.S.A.) buffered with 0.05 M sodium cacodylate (pH 7.4). The cells were detached from the dishes with a rubber policeman and further fixed as above for 45 min. Then, the cells were washed three times for 30 min in 0.05 M sodium cacodylate buffer, post-fixed in a mixture of 1 % osmium tetroxide (Polysciences) and 1 % potassium ferrocyanide for 60 min, incubated for 1 min with

0.15 % tannic acid in 0.1 M sodium cacodylate buffer and washed overnight in 0.1 M sodium cacodylate buffer. All these treatments were performed at 0–4 °C. The following day, the fixed cells were stained with 2 % (w/v) uranyl acetate for 2 h at 20 °C and dehydrated, embedded in Poly/Bed 812 resin (Polysciences) and polymerized according to the manufacturer's instructions. Ultrathin sections of approx. 60–70 nm were cut with an LKB 4801 A ultramicrotome, mounted on copper grids, stained with Reynold's lead citrate and examined in a Philips CM-10 electron microscope at 60 kV.

Morphometric analysis of lysosomes was performed in randomly selected electron micrographs (18 cm × 24 cm) at a final magnification of ×10 500 by standard methods [26]. For each measurement, the fractional volume of lysosomes was estimated by the point counting method in 30 electron micrographs from three different experiments. Lysosomes were identified using morphological criteria described previously [26].

Western blot

For immunoblot analysis with an alkaline phosphatase detection system, lysates of cells were prepared in RIPA buffer (150 mM NaCl/1 % Nonidet P40/0.5 % sodium deoxycholate/0.1 % SDS/50 mM Tris, pH 8.0) containing 0.1 mM leupeptin and 1 mM PMSF. Proteins (50 µg) from the various lysates were separated on 6 or 8 % (for experiments with anti-ubiquitin antibodies) and 15 % (for experiments with anti-proteasome antibodies) acrylamide slab gels and transferred to nitrocellulose membranes (electrophoresis grade, 0.45 µm pore size; Amersham Biosciences, Little Chalfont, Bucks., U.K.) for 16 h at 30 V, using a blotting-tank transfer cell (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, U.S.A.). The membranes were stained for 2 min with 0.2 % (w/v) Ponceau S (Sigma) solution in 3 % (w/v) trichloroacetic acid, destained with PBS for 5 min, blocked with 5 % (w/v) skimmed milk (in PBS) and reacted at 20 °C for 16 h with the various antibodies. Primary and secondary antibodies were applied in 3 % (w/v) BSA in PBS plus 0.02 % sodium azide. Secondary antibodies were incubated for 1 h at 20 °C. Between incubations, membranes were rinsed three times for 5 min with PBS. After the last wash, the blots were incubated for 10 min in alkaline phosphatase buffer and stained with Nitro Blue Tetrazolium and 5-bromo-5-chloro-3-indolyl phosphate *p*-toluidine salt (Sigma) by standard methods. The bands were quantified by densitometric analysis of the Western blots using either a 2202 Ultrascan laser densitometer from Pharmacia LKB (Uppsala, Sweden) with a Hewlett-Packard (Palo Alto, CA, U.S.A.) 3396 Series II integrator or SigmaGel software from Jandel Scientific (Ekrath, Germany). Both procedures gave similar results. The linearity of the method [27] was established for each antibody using 20 and 26 S proteasome preparations purified from rat liver [28] and recombinant PA28 [29].

Other general procedures were performed as described previously [30]. All experiments, except the morphometric analysis of lysosomes (see above), were performed at least four times with duplicate or triplicate samples. Statistical analysis was performed by the Student's *t* test.

RESULTS

Analysis of various inhibitors of the proteasomal and lysosomal proteolytic pathways

The degradation rates of long-lived intracellular proteins, labelled as described in the Experimental section, were followed for 24 h in normal human fibroblasts under four different situations

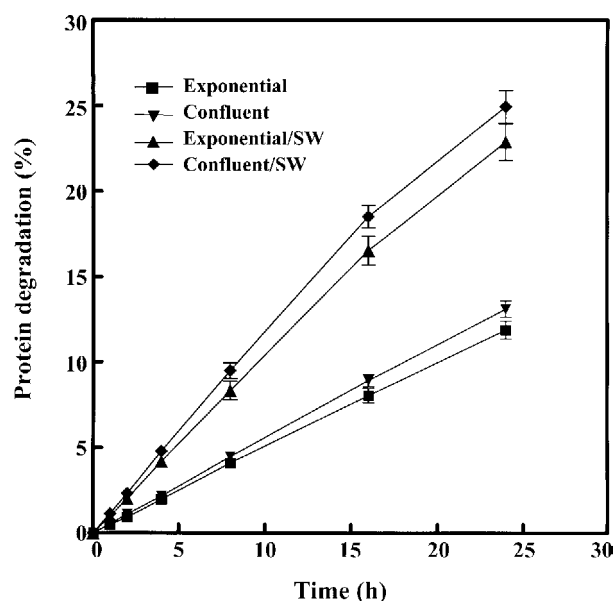


Figure 1 Kinetics of the degradation of long-lived proteins in human fibroblasts under various conditions

Protein degradation at different chase times was measured by the release of trichloroacetic acid-soluble radioactivity (expressed as a percentage of the initial radioactivity) from cells labelled previously with L-[³H]leucine as described in the Experimental section. ■, Exponential growth ($k_d = 0.0053 \pm 0.0003 \text{ h}^{-1}$); ▼, confluent phase ($k_d = 0.0059 \pm 0.0002 \text{ h}^{-1}$); ▲, exponential growth + SW ($k_d = 0.0110 \pm 0.0007 \text{ h}^{-1}$); ◆, confluent phase + SW ($k_d = 0.0122 \pm 0.0006 \text{ h}^{-1}$). Values are the means \pm S.D. from five separate experiments with duplicate samples. Differences from exponential conditions were significant at $P < 0.05$ (confluent phase) or $P < 0.0005$ (SW conditions).

(exponential growth and confluent conditions, with or without serum). L-[³H]leucine- or L-[³H]valine-labelled human fibroblasts lost protein radioactivity at a similar rate, indicating that leucine and valine residues are equally valid as labelling reagents to investigate the degradation of proteins in these cells and under the conditions analysed here (see the Experimental section). As shown in Figure 1, in confluent cultures in the presence of serum there is a slight, but significant, increase in the degradation rate of long-lived proteins as compared with exponentially growing cells. In exponentially growing cells and in confluent cultures, SW increased the proteolytic degradation rates by almost two times. Again, as in the presence of serum, degradation was also consistently higher in confluent cultures than in exponentially growing cells. In all cases, degradation of labelled proteins followed first-order exponential kinetics (not shown) with an apparent half-life ($t_{1/2}$) of $130.8 \pm 7.5 \text{ h}$ (exponential), $117.5 \pm 4.3 \text{ h}$ (confluent), $63.0 \pm 4.1 \text{ h}$ (exponential/SW) and $56.8 \pm 2.8 \text{ h}$ (confluent/SW); all these values are means \pm S.D. from five different experiments; differences from exponential half-life were significant at $P < 0.05$ or less, and differences between exponential/SW and confluent/SW half-lives were significant at $P < 0.05$.

Next, we tried to select specific inhibitors for the various degradation pathways of intracellular proteins. In eukaryotic cells, proteasomes and lysosomes represent the major proteolytic systems. Therefore we analysed the effects of widely employed inhibitors of both pathways on the degradation of long-lived proteins in exponentially growing cells under SW. We choose these conditions because degradation of proteins is enhanced (see Figure 1) and also because in many cells it is usually believed that lysosomes are not important for intracellular protein degradation under basal metabolic conditions [6]. Similar inhibitions were

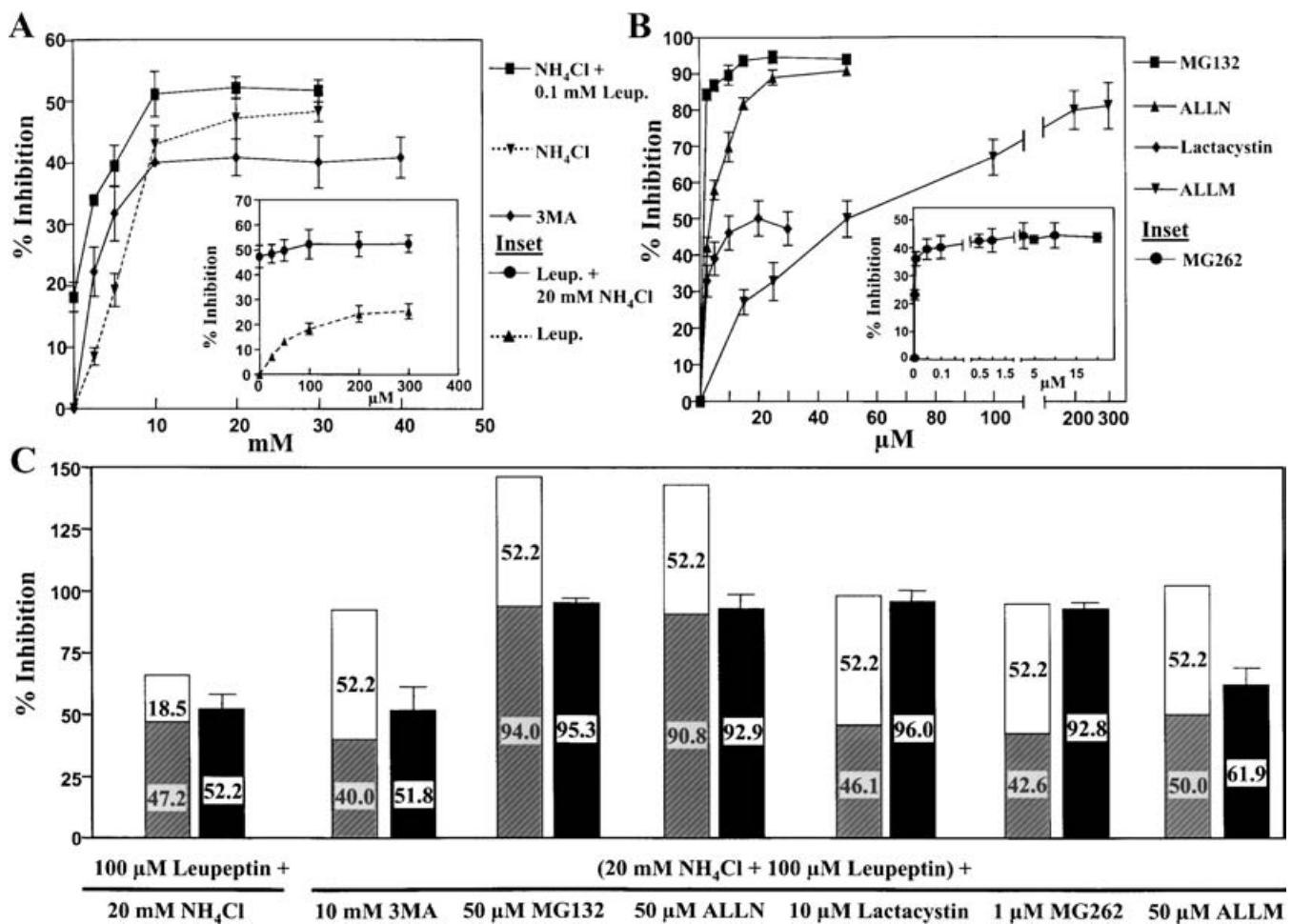


Figure 2 Effects of various lysosomal and proteasomal inhibitors on the degradation of long-lived proteins in exponentially growing human fibroblasts subjected to SW for 4 h

(A) Inhibition of protein degradation by various concentrations of NH_4Cl (\blacktriangledown), NH_4Cl + 0.1 mM leupeptin (\blacksquare) and 3-MA (\blacklozenge). The inset shows the inhibition produced by various concentrations of leupeptin (\blacktriangle) and leupeptin + 20 mM NH_4Cl (\bullet). (B) Inhibition of protein degradation by various concentrations of MG132 (\blacksquare), ALLN (\blacktriangle), lactacystin (\blacklozenge) and ALLM (\blacktriangledown). The inset shows the inhibition produced by various concentrations of MG262 (\bullet). (C) Inhibition of protein degradation by various combinations of inhibitors at the indicated concentrations (the ones on the right in each pair of histograms). The separate effects by each inhibitor of the combinations tested (as indicated below) and, thus, the expected additive values are also shown (the ones on the left in each pair of histograms). Inhibition is expressed as percentage, and each value is the mean \pm S.D. from at least four separate experiments with duplicate samples.

obtained when using L-[^3H]leucine or L-[^3H]valine to label long-lived proteins. Figure 2 summarizes the more relevant observations obtained in this search.

Among various well-established inhibitors of lysosomes (bafilomycin A, concanamycin A, pepstatin A, leupeptin, chloroquine and NH_4Cl , and combinations thereof, assayed at various concentrations), we found that using NH_4Cl (20 mM) + leupeptin (0.1 mM) produced the highest inhibition of intracellular protein degradation (results not shown). Thus Figure 2(A) shows the inhibition produced by various concentrations of NH_4Cl and leupeptin (inset), each alone or in combination with a fixed concentration (0.1 mM leupeptin and 20 mM NH_4Cl respectively) of the other lysosomal inhibitor. It is clear that most of the observed combined inhibition is due to NH_4Cl , since the inhibition produced by this weak base alone (especially at 20 mM or higher concentrations) was only slightly below (< 10%) the inhibition produced by leupeptin + NH_4Cl (see also Figure 2C, the two histograms on the left). Thus most of the inhibition of protein degradation produced by leupeptin in human fibroblasts is also affected by NH_4Cl .

The main lysosomal pathway for intracellular protein degradation is macroautophagy and formation of autophagic vacuoles has been found to be completely inhibited by the drug 3-MA [23]. In human fibroblasts, 3-MA produced its maximal inhibitory effect on proteolysis at 10 mM (Figure 2A). Wortmannin, a well-known inhibitor of PI3K (phosphoinositide 3'-kinase), had a similar effect at 100 nM or higher concentrations (results not shown), in good agreement with the conclusion that 3-MA affects macroautophagy in hepatocytes by inhibition of these enzymes [31]. In Figure 2(A), notice that, in serum-deprived exponentially growing cells, the inhibitory effect on proteolysis produced by 3-MA was high, but significantly ($P < 0.05$ or less) below the values obtained with leupeptin + NH_4Cl (or even NH_4Cl alone) when the three inhibitors were used at their optimal concentrations (see also Figure 2C, the second pair of histograms).

We also tested various agents which have been used by others to inhibit proteasomes in mammalian cells (Figure 2B). The most effective inhibitor was MG132, which, at 10 μ M or higher concentrations, blocked 90% or more of the degradation of intracellular proteins in the absence of serum. This was observed with

MG132 obtained from two different sources (see the Experimental section). ALLN was also quite effective in inhibiting proteolysis when used at high concentrations. In contrast, the maximal inhibition with lactacystin was only approximately half of the inhibition obtained with MG132 and ALLN (Figure 2B). Results similar to those observed for lactacystin were obtained with clasto-lactacystin β -lactone and epoxomicin, another proteasome inhibitor (results not shown). We also performed experiments with MG262, a boronate derivative of MG132, which is considered more potent than MG132 against purified proteasomes [32]. As shown in Figure 2(B, inset), although MG262 produced its effect at very low concentrations, its maximal inhibition was slightly less than the maximal inhibition obtained with lactacystin.

Next, we analysed the effects produced by combinations of leupeptin + NH_4Cl with 3-MA, MG132, ALLN and lactacystin (Figure 2C). All these agents were used at their optimal concentrations to produce maximal inhibition (see Figures 2A and 2B). To facilitate comparisons, the expected additive values of the inhibitions, produced when used separately, are also indicated by a combined histogram on the left of the experimental values obtained for the various combinations of inhibitors. Thus (Figure 2C, the second pair of histograms), addition of 3-MA does not further increase the inhibition produced by NH_4Cl + leupeptin (51.8 versus 52.2%). Therefore we assume that NH_4Cl + leupeptin fully inhibit macroautophagy and that the percentage of protein whose degradation is inhibited by them but not by 3-MA should represent the protein which is degraded by lysosomal pathways different from macroautophagy (i.e. microautophagy, chaperone-mediated autophagy, etc., see below). With proteasomal inhibitors, it is clear that, among MG132, ALLN and lactacystin, only the last (and also clasto-lactacystin β -lactone and epoxomicin; results not shown) produces a suitable additive effect with NH_4Cl + leupeptin (Figure 2C). The inhibitions produced by MG262 and NH_4Cl + leupeptin were also additive (Figure 2C, second to last pair of histograms). These results indicate that MG132 and ALLN, at least under the conditions investigated here, also inhibit lysosomal pathways quite efficiently. This strong inhibition of lysosomal pathways was also observed at lower concentrations of MG132 (10, 15 and 25 μM) and ALLN (25 μM), whereas, as expected, the inhibitory effects of lactacystin at lower concentrations were also additive with the inhibition produced by NH_4Cl and leupeptin (results not shown). When MG132 and ALLN were combined with lactacystin, NH_4Cl + leupeptin and/or 3-MA, it could be calculated (by comparing their effects with those produced by leupeptin plus NH_4Cl , 3-MA and/or lactacystin) that MG132 or ALLN, inhibited 95–100% of both lysosomal (by macroautophagy or by other lysosomal pathways) and proteasomal degradation of long-lived proteins. We also tested, in similar experiments, the effect of ALLM at 50 μM , because it is also known to inhibit proteasomes [33]. However, it should be noted that, at 50 μM , ALLM produces only approx. 60% of the maximal inhibitory effect, which is obtained at 200–300 μM (Figure 2B). Although there is some additive effect of ALLM with leupeptin + NH_4Cl (Figure 2C, last pair of histograms), ALLM at this concentration also inhibits approx. 77.2% of the lysosomal degradation, but inhibits only 21.0% of the proteasomal degradation. However, the inhibition of the proteasomal degradation increases at higher ALLM concentrations (e.g. it is approx. 68.9% at 100 μM). Thus, perhaps it may be possible to discriminate among the contributions of the various proteolytic pathways to the degradation of intracellular proteins when using various concentrations of this inhibitor.

At any rate and in conclusion, in the following experiments, we used leupeptin (0.1 mM) + NH_4Cl (20 mM) to inhibit all lysosomal pathways, 3-MA (10 mM) to inhibit macroautophagic

degradation and lactacystin (20 μM) to inhibit proteasomal pathways of protein degradation. The contribution of the non-macroautophagic lysosomal pathways was calculated by subtracting the inhibition obtained with 3-MA from the inhibition obtained with NH_4Cl + leupeptin. Finally, the contribution of non-lysosomal and non-proteasomal pathways to intracellular degradation was calculated from the degradation remaining after the combined inhibition with lactacystin and NH_4Cl + leupeptin or after treatment with MG132 (50 μM), which at this concentration inhibits almost totally the lysosomal and proteasomal pathways of intracellular protein degradation.

Contribution of the main proteolytic pathways to the degradation of long-lived proteins in human fibroblasts under various conditions

In previous experiments, we established the precise conditions for exponential growth and confluency in human fibroblasts and for treatments with inhibitors without loss of cell viability (see the Experimental section). Next, the effects of the various proteolytic inhibitors on the degradation of long-lived proteins were tested under these two conditions, with or without (0–4 h) serum. Since prolonged serum starvation in confluent cells is believed to activate the degradation of proteins by chaperone-mediated autophagy [19], we also analysed confluent cultures subjected to deprivation of serum for 24–28 h (prolonged starvation). As shown in Figure 3, clear differences were found in the effects of the different inhibitors under the various conditions. Thus in the presence of serum and under exponential conditions, 50–55% of the long-lived proteins were degraded by proteasomes (Figure 3A). The remaining proteins were degraded by non-macroautophagic lysosomal (25–30%) and other non-lysosomal (15–20%) pathways. Under confluent conditions with serum, the main difference from exponential conditions was a moderate increase in the activity of the non-macroautophagic lysosomal pathways (from 28.1 ± 2.0 to $34.6 \pm 3.3\%$; differences significant at $P < 0.05$), which fully explains the slightly higher degradation observed under these conditions (see Figure 1). The contribution of non-proteasomal and non-lysosomal pathways to the degradation of intracellular proteins remained nearly the same under exponential and confluent conditions with serum (18.4 and 17.8% respectively). Under these two conditions, we could not detect any inhibition of the degradation of long-lived proteins by the macroautophagic inhibitor 3-MA. In fact, in the presence of serum, addition of 3-MA apparently increased the degradation rate (by approx. 1–5%) of long-lived proteins, especially in exponentially growing cells. Although this increase in protein degradation may appear to be low, it should be pointed out that it was consistently observed.

Under SW (0–4 h), there is a large increase in macroautophagy in both exponentially growing and confluent cells, and approx. 40% of the total degradation of long-lived proteins under these two conditions occurs by this pathway. Since, under SW, degradation of proteins increases by approx. 100% (see Figure 1), the variations in activity of the various pathways under these conditions, when compared with cells incubated in the presence of serum, are more evident in Figure 3(B), which shows the percentage of protein degraded per hour by the various pathways. From these results, it can be calculated that macroautophagy is responsible for approx. 80% of the SW-induced degradation. Owing to the large increase in macroautophagy, the contribution (in percentage) of proteasomes to the degradation of long-lived proteins under SW decreases moderately (Figure 3A). However, proteasomes degrade much more protein (approx. 1.7 times more in exponentially growing cells) under these conditions

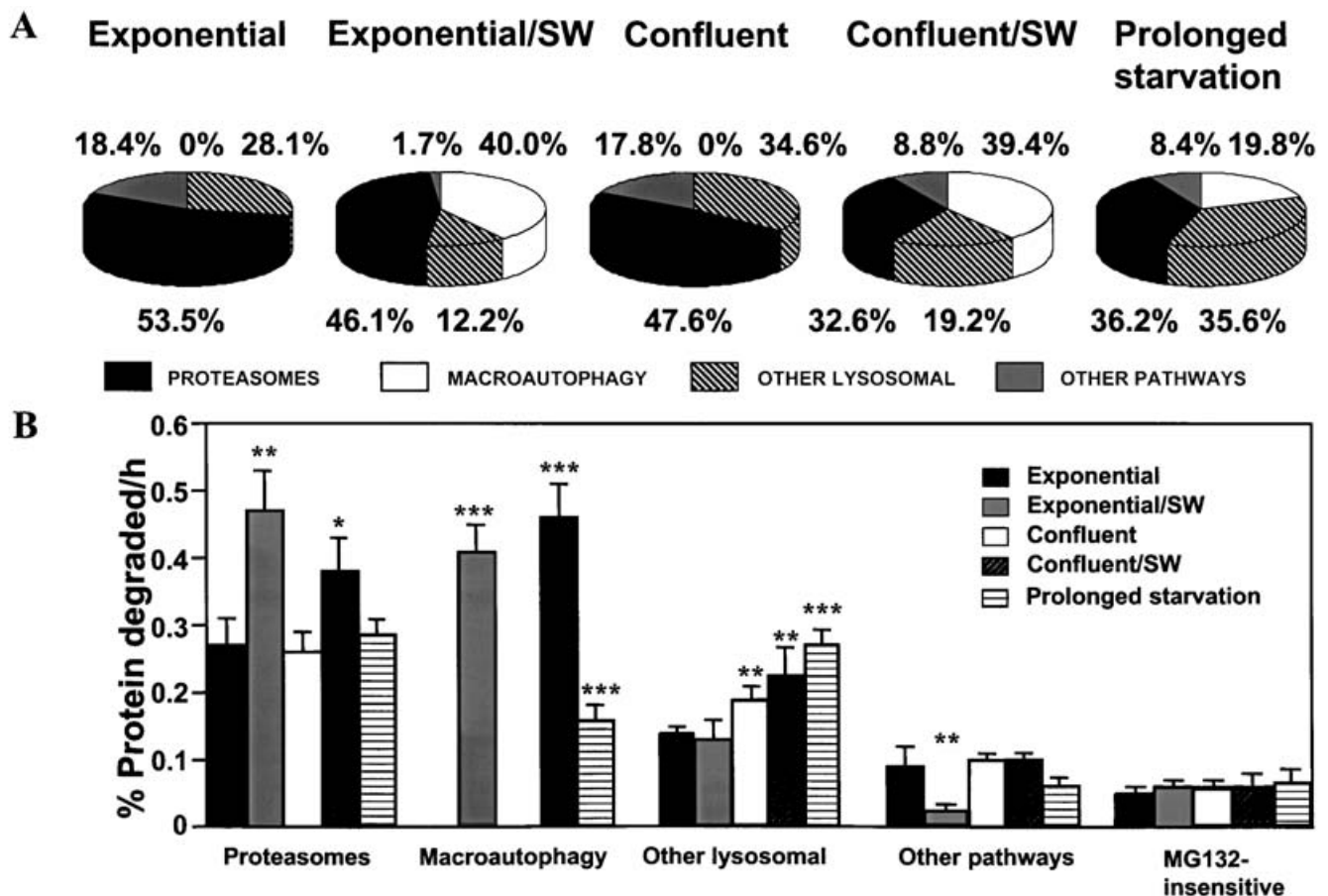


Figure 3 Contribution of various proteolytic pathways to the degradation of long-lived proteins in human fibroblasts under various conditions

The contribution of proteasomes, macroautophagy, other lysosomal pathways ('other lysosomal') and other non-lysosomal pathways different from proteasomes ('other pathways') under the indicated conditions (exponential, exponential + 4 h SW, confluent, confluent + 4 h SW and prolonged starvation) was calculated as described in the text, using lactacystin to inhibit proteasomes, 3-MA to inhibit macroautophagy and NH_4Cl + leupeptin to inhibit macroautophagy and other lysosomal pathways. The results are presented either as percentage of inhibition (**A**) or as percentage of the labelled protein whose degradation is inhibited per hour by the various inhibitors (**B**). Since MG132 inhibits both proteasomal and lysosomal pathways (see Figure 2), the contribution of other (non-lysosomal, non-proteasomal) pathways shown in (**B**) is also calculated from the degradation remaining after treatment with this inhibitor (MG132-insensitive). Each value is the mean from at least four separate experiments with duplicate samples. S.D. values are also shown in (**B**). Differences from exponential conditions were significant at * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$ and *** $P < 0.0005$.

(Figure 3B). In fact, in exponentially growing cells, it can be calculated that the increased degradation of long-lived proteins under SW, which is not due to macroautophagy (approx. 20%), is produced by the activity of proteasomes (Figure 3B). In contrast, in confluent cultures deprived of serum, the contribution (in percentage) of proteasomes to the degradation of long-lived proteins decreases to approx. 33% (Figure 3A) and the increase in the degradation by proteasomes is also less marked (Figure 3B). Finally, the degrading activity of other non-lysosomal and non-proteasomal pathways under SW (see Figure 3B) is either the same (as assessed by the degradation remaining after MG132 treatment, which inhibits both lysosomal and proteasomal pathways quite efficiently, as mentioned above), or it is inhibited under SW in exponentially growing cells but not in confluent cells (as assessed by the remaining degradation after treatment with lactacystin and NH_4Cl + leupeptin).

In confluent cells, prolonged starvation decreased the degradation of proteins by approx. 30% when compared with the first 4 h of SW (from $1.22 \pm 0.06 \text{ h}^{-1}$ under confluent/SW to $0.80 \pm 0.04 \text{ h}^{-1}$ under prolonged starvation; differences significant at $P < 0.0005$). This decrease is mainly due to decreased (from 39.4 ± 4.4 to 19.8 ± 2.1 %; differences significant at

$P < 0.0005$) macroautophagic degradation of proteins. The contribution of proteasomes to the degradation of proteins under prolonged starvation is little affected (it varies from 32.6 to 36.2%). Also, the small contribution of non-lysosomal and non-proteasomal pathways of protein degradation is not affected by prolonged starvation. In contrast, the relative importance of non-macroautophagic lysosomal pathways increases from 19.2 ± 3.0 % during the first 4 h of SW to 35.6 ± 2.8 % (differences significant at $P < 0.0005$) under prolonged starvation.

Changes in the levels of lysosomes and proteasomes in human fibroblasts under various growth conditions

To determine whether the observed variations in the contribution of lysosomes to the degradation of proteins could be correlated with lysosomal morphological changes, we examined the electron microscopic appearance of human fibroblasts under the various conditions investigated (Figure 4). A morphometric analysis of lysosomes was also made in the cells under each of the growth conditions (Table 1). Lysosomes, which were not frequent in exponentially growing cells and confluent cells, increased in serum-deprived cells, and the increases in the lysosomal fractional

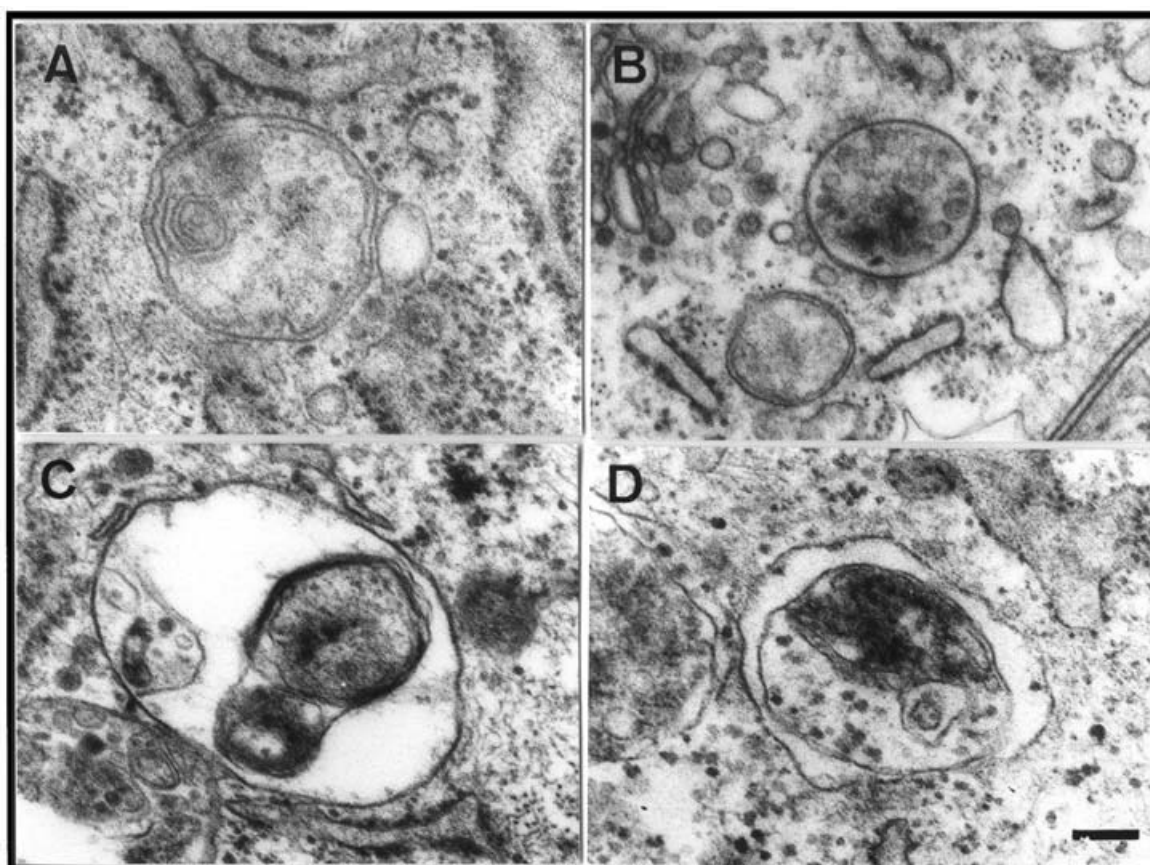


Figure 4 Appearance of lysosomes in human fibroblasts subjected or not to serum starvation as seen by electron microscopy

Representative micrographs showing typical lysosomes in cells under the following conditions: exponential growth (A), confluent phase (B), exponential growth + 4 h SW (C) and confluent phase + 4 h SW (D). Scale bar, 0.2 μm .

Table 1 Effect of various growth conditions on the fractional volume of lysosomes in human fibroblasts

Results, which are pooled from three different experiments, are shown as means \pm S.D., which are then converted into a percentage of the exponential growth values (within parentheses). These values are compared with the corresponding variations in the turnover rate k_d of long-lived proteins (see Figure 1) and in the percentage of protein degradation which occurs by lysosomal pathways (see Figure 3). Differences from exponential conditions were significant at * $P < 0.05$ and ** $P < 0.005$.

Growth conditions	Lysosomal fractional volume (mm^3/cm^3 of cytoplasm)	k_d (h^{-1})	Lysosomal protein degradation (%)
Exponential	35.6 ± 2.7 (100)	0.0053 (100)	28.1 (100)
Exponential/SW	82.8 ± 8.4 (233)**	0.0110 (208)	52.2 (186)
Confluent	41.8 ± 3.4 (117)	0.0059 (111)	34.6 (123)
Confluent/SW	78.4 ± 6.6 (220)**	0.0122 (230)	58.6 (209)
Prolonged starvation	51.2 ± 4.5 (144)*	0.0080 (151)	55.4 (197)

volume (Table 1) are in general in good agreement with the variations produced in the turnover rates (see Table 1 and Figure 1) and with the observed contribution of lysosomes to the degradation of proteins (see Table 1 and Figure 3). The morphology of lysosomes was also different in the presence of serum (Figures 4A and 4B) and under SW (Figures 4C and 4D). In this latter case, lysosomes were larger and their morphologies correspond to typical autophagic vacuoles containing cellular

material in various stages of degradation. The morphology of lysosomes confirms that, as already suggested by the effects of inhibitors, different lysosomal mechanisms of protein degradation occur in response to various conditions; i.e. macroautophagy operates only under SW, whereas lysosomal mechanisms different from macroautophagy are also operative in the presence of serum. Under prolonged starvation, the electron microscopic appearance of lysosomes (Figure 5) was similar to that of confluent cells deprived of serum for 4 h (see Figure 4D); however, autophagic vacuoles (Figure 5A) were less abundant and smaller (notice that the scale bars in Figures 4 and 5 correspond to 0.2 and 0.1 μm respectively) and lysosomes resembling residual bodies and containing abundant remnants of membranes were also frequent (Figure 5B).

To explain the observed variations in the activity of proteasomes (Figure 3), we also examined the levels of various subunits from different proteasome complexes using specific antibodies (see the Experimental section). It appears (Figure 6 and Table 2) that, under the various growth conditions investigated, there is no change in the intracellular levels of two α -subunits (C8 and C9) of the 20 S proteasome. In contrast, we found that, under confluent conditions, with or without serum, the levels of two component subunits (p45 and S3) of the 19 S particle that forms the 26 S proteasome decreased slightly, whereas the levels of two subunits, one of the 11 S regulatory complex (PA28 β) and the other of the immunoproteasome (LMP2), increased to a large extent (Table 2). Interestingly, the level of Y, the β -subunit of 20 S

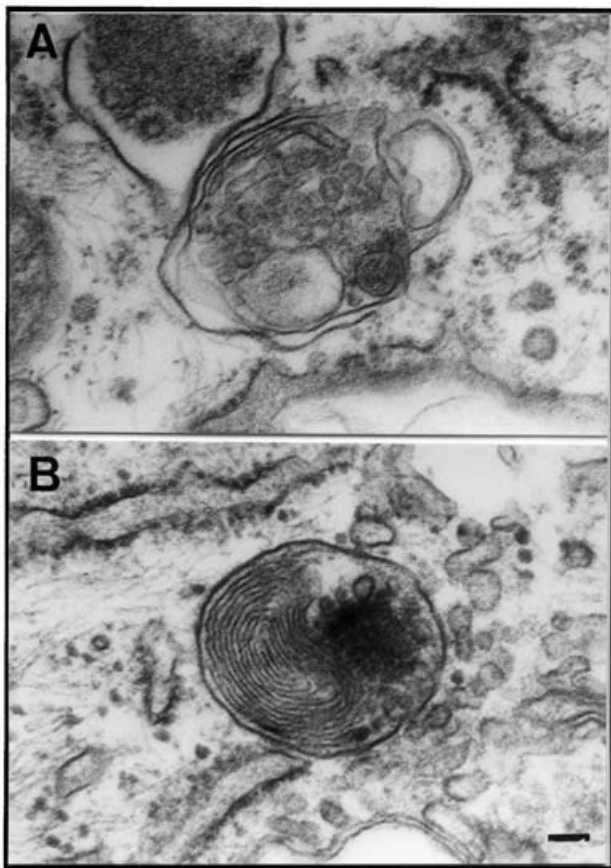


Figure 5 Effect of prolonged starvation on appearance of lysosomes in human fibroblasts as seen by electron microscopy

Representative electron micrographs showing the typical appearance of lysosomes in confluent fibroblasts subjected to prolonged serum starvation (28 h). The micrographs show a lysosome resembling an autophagic vacuole (A) and a residual body containing abundant membrane fragments (B). Scale bar, 0.1 μm .

proteasomes, which is interchangeable with LMP2, also decreased to the same extent as the two components of the 19 S particle (see Table 2). Under prolonged starvation, the levels of proteasome subunits do not apparently change when compared with the first 4 h of SW. Thus confluent conditions affect proteasomes in a way that resembles the effect of interferon- γ , which is known to increase the level of immunoproteasomes and PA28 proteasome complexes and to decrease the level of 26 S proteasomes (see [34] for a review). It appears therefore that, in confluent cells, some parts of the 26 S complexes present under exponential growth are substituted by PA28-immunoproteasomes (Table 2). This may explain the decreased activity (in percentage) of proteasomes in human fibroblasts under confluent conditions (see Figure 3A).

However, the increase in the degradation of proteins by proteasomes observed under SW, especially in exponentially growing cells (see Figure 3B), cannot be explained by changes in the levels of proteasomes or their complexes, which even decreased slightly (see Table 2). Therefore it is quite probably due to changes in the substrate proteins which make them more susceptible to degradation by the ubiquitin-proteasome system. In fact, immunoblot analysis with antibodies which recognize ubiquitinated proteins (Figure 7) show that, in the presence of MG132, which is amply used to reveal ubiquitinated proteins (see e.g. [33,35]), these proteins accumulate more in exponentially growing cells

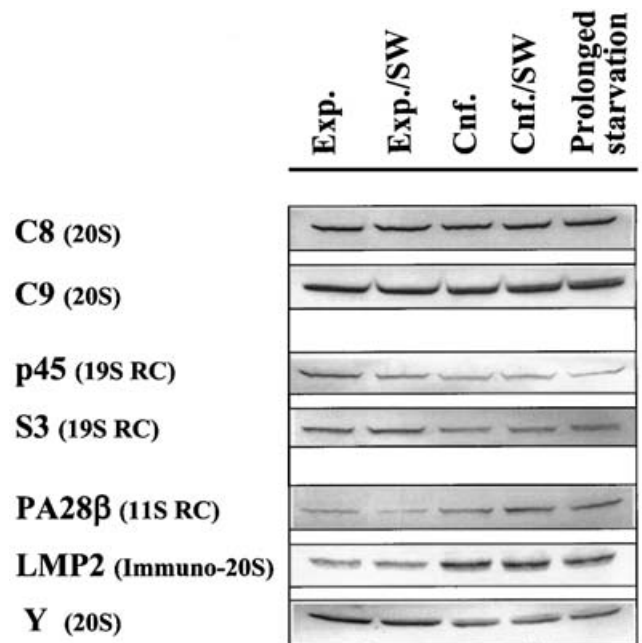


Figure 6 Changes in levels of various subunits of proteasomal complexes from human fibroblasts produced by confluent conditions

Total cell extracts (50 μg) from exponentially growing (Exp.) or confluent (Cnf.) cultures of human fibroblasts, incubated with or without serum for 4 h (SW) or 28 h (Prolonged starvation), were separated by SDS/PAGE and the gels were immunoblotted with antibodies raised against the following subunits, as indicated: C8 and C9 (20 S proteasomes), p45 and S3 (19 S regulatory complex; 19 S RC), PA28 β (11 S regulatory complex; 11 S RC), LMP2 (immunoproteasomes; Immuno-20 S) and Y (an interchangeable subunit of 20 S proteasomes). Relative levels of the various subunits were determined by densitometric analysis. The Figure shows representative gels from the number of experiments indicated in Table 2.

Table 2 Relative levels of various subunits of proteasomes in human fibroblasts under different growth conditions

Immunoblots, derived from the number of preparations (within parentheses after the subunit that was analysed), were prepared as described in the Experimental section. They were suitably developed as in Figure 6 and densitometrically analysed. The data were calculated for the same amount of bulk protein in each condition and are presented as percentage of the total absorbance in exponentially growing cells. For abbreviations, see the legend to Figure 6. Differences from anti-C8 and anti-C9 were significant at * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$ and *** $P < 0.0005$.

Subunit	Complex	Exp.	Exp./SW	Cnf.	Cnf./SW	Prolonged starvation
C8 (6)	20 S	100	93 \pm 9	99 \pm 5	102 \pm 13	101 \pm 12
C9 (6)	20 S	100	99 \pm 8	99 \pm 7	102 \pm 12	105 \pm 2
p45 (6)	19 S RC	100	95 \pm 8	69 \pm 9***	77 \pm 10**	77 \pm 8**
S3 (6)	19 S RC	100	93 \pm 10	72 \pm 11**	81 \pm 11*	77 \pm 12**
PA28 β (6)	11 S RC	100	90 \pm 12	222 \pm 32***	236 \pm 30***	230 \pm 60**
LMP2 (6)	Immuno-20 S	100	90 \pm 12	208 \pm 38***	210 \pm 35***	232 \pm 41***
Y (4)	20 S	100	96 \pm 16	75 \pm 18*	73 \pm 21*	63 \pm 23*

deprived of serum (Figure 7B, 'Exp./SW') than in exponentially growing cells incubated in the presence of serum ('Exp.').

Contribution of the main proteolytic pathways to the degradation of long-lived proteins in human fibroblasts under amino acid starvation

Amino acids are key regulators of proteolysis (see e.g. [36] for a review). To obtain information about the maximal capacity of

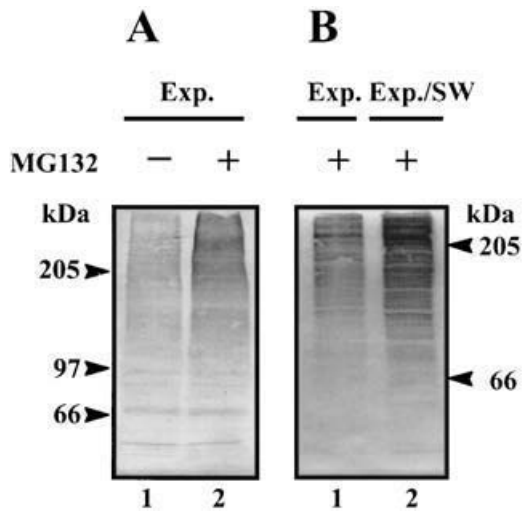


Figure 7 Increased ubiquitination of proteins in exponentially growing human fibroblasts after serum withdrawal

Proteins (45 μ g) from exponentially growing fibroblasts, incubated with serum ('Exp.'; **A**, lanes 1 and 2; **B**, lane 1) or without serum ('SW'; **B**, lane 2) for 4 h and treated (**A**, lane 2; **B**, lanes 1 and 2) or not (**A**, lane 1) with 50 μ M MG132 for the same incubation period, were extracted with RIPA buffer and then analysed in a Western blot developed with an antibody which recognizes ubiquitinated proteins. (**A**, **B**) show 6 and 8% acrylamide gels respectively.

each of the proteolytic pathways under extreme conditions, MEM was replaced by Krebs–Henseleit salt medium without amino acids. Cell viability, checked by Trypan Blue exclusion, was above 95% at the end of the 4 h incubations. During this period, degradation followed first-order exponential kinetics with turnover rates (k_d) of $0.0113 \pm 0.0011 \text{ h}^{-1}$ (exponential), $0.0180 \pm 0.0019 \text{ h}^{-1}$ (exponential/SW), $0.0091 \pm 0.0003 \text{ h}^{-1}$ (confluent), $0.0139 \pm 0.0005 \text{ h}^{-1}$ (confluent/SW) and $0.0102 \pm 0.0008 \text{ h}^{-1}$ (prolonged starvation). All these values are means \pm S.D. from four different experiments and, except for prolonged starvation, they are significantly different from exponential conditions at $P < 0.05$ or less. Notice that, compared with the k_d values obtained in the presence of amino acids (see Table 1), there is increased degradation, especially in exponentially growing cells.

Effects of the various proteolytic inhibitors on the degradation of long-lived proteins were then investigated (Figure 8). Under all conditions, and in contrast with experiments performed in the presence of amino acids (Figure 3), lysosomes (macroautophagy plus other lysosomal pathways) become more important than proteasomes in the degradation of proteins. Amino-acid deprivation mainly increases macroautophagy under all conditions. It also increases, to a minor extent, the activity of proteasomes (only in exponentially growing cells) and of other non-lysosomal and non-proteasomal pathways (only under confluent conditions), whereas, similarly to SW, it does not affect lysosomal pathways different from macroautophagy (cf. the amount of protein

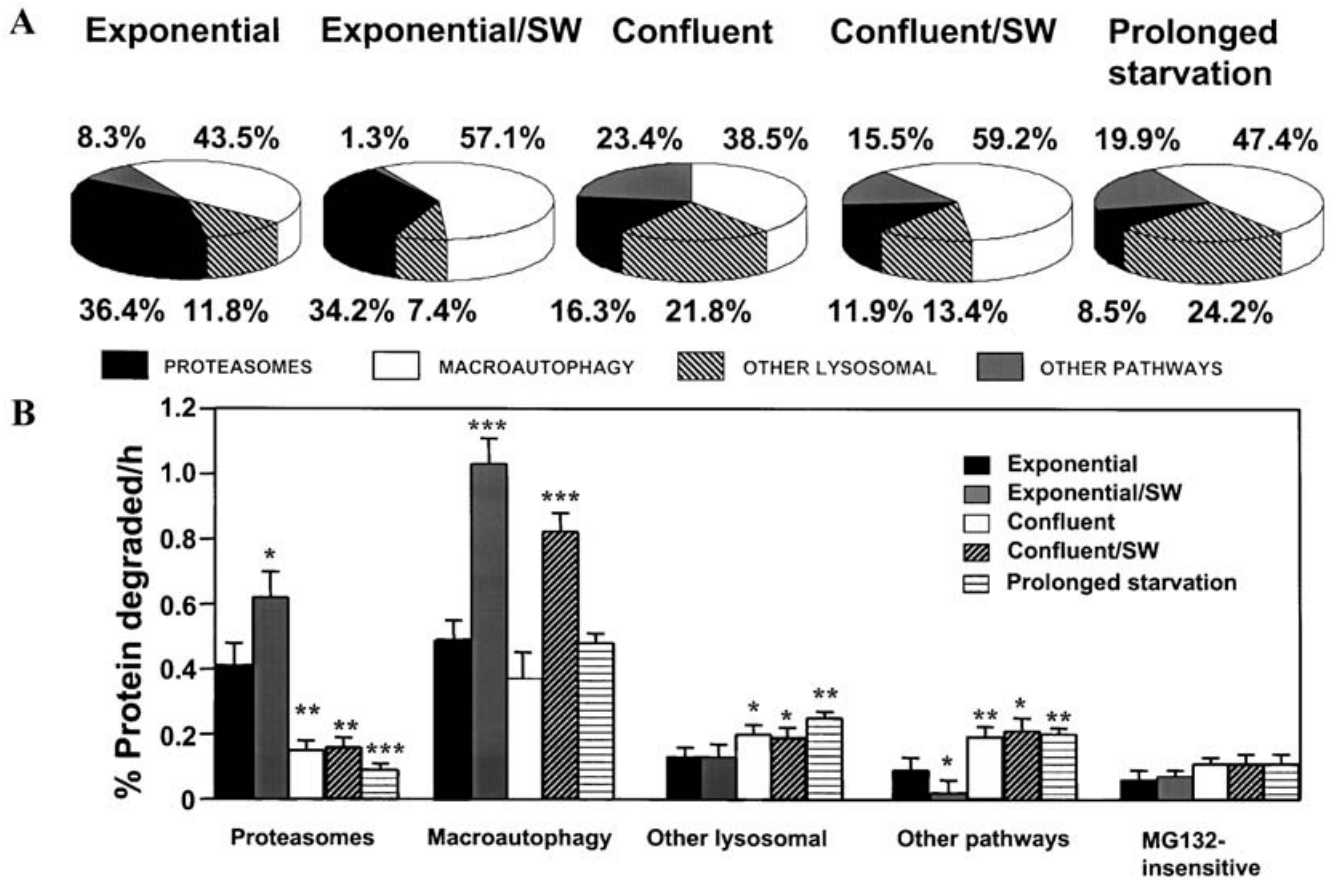


Figure 8 Contribution of various proteolytic pathways to the degradation of long-lived proteins in human fibroblasts under amino acid starvation

Experiments and calculations were performed as described in the legend to Figure 3, but in the absence of amino acids. Each value is the mean from four separate experiments with duplicate samples. S.D. values are also shown in (**B**). When compared with Figure 3(B), scale differences can be noticed in the ordinate values. Differences from exponential conditions were significant at $*P < 0.05$, $**P < 0.005$ and $***P < 0.0005$.

degraded per hour by the various pathways in Figures 3B and 8B). Moreover, most variations in the activity of the various proteolytic pathways produced by confluent conditions and SW in the absence of amino acids were qualitatively similar to those observed in the presence of amino acids. Thus proteasomes degrade more protein in exponentially growing cells under SW, whereas in confluent cells there is a decrease in their activity (from approx. 34–36% in exponentially growing cells to approx. 9–16% under confluent conditions), which is much more marked than in the presence of amino acids (cf. Figures 3A and 8A). Also, as in the presence of amino acids (Figure 3), the following significant changes in the activity of the various pathways, when compared with exponentially growing cells, were observed: (i) a large increase in macroautophagy under SW, (ii) a moderate increase in the activity of the non-macroautophagic lysosomal pathways under confluent conditions, (iii) a decrease in macroautophagy and an increase in non-macroautophagic lysosomal pathways under prolonged starvation, and (iv) an inhibition of other non-lysosomal and non-proteasomal pathways in exponentially growing cells under SW. Finally, as in the presence of amino acids, there were no significant differences in the MG132-insensitive proteolysis.

DISCUSSION

By employing specific inhibitors, we monitored the role of the main proteolytic pathways in the degradation of intracellular proteins in human fibroblasts under various growth conditions. With lysosomal inhibitors, we found that NH_4Cl + leupeptin is the most effective of all combinations tested in the present study. Much of this inhibition is due to ammonia, which has been shown to enter lysosomes, consuming protons and increasing the intralysosomal pH [37]. However, the peptide inhibitor leupeptin, which inhibits lysosomal cysteine proteases such as cathepsins B, H and L [37], further increases the inhibition produced by ammonia. Although some non-lysosomal proteases (e.g. calpains) are also inhibited by leupeptin under *in vitro* conditions, it has been shown that leupeptin, similarly to *trans*-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino)butane, does not readily permeate membranes, and thus its uptake into cells occurs by endocytosis [38]. Therefore, most probably, the additional effect of leupeptin, in the inhibition produced by NH_4Cl alone, is due to inhibition of the residual activity of lysosomal cysteine proteases at the near-neutral lysosomal pH produced by ammonia. In this regard, it should be noticed that the optimal pH of cysteine cathepsins (pH 3.5–6) is more close to neutral pH when compared with that of aspartic cathepsins, which is more acidic (pH 3–5).

To inhibit macroautophagy, we used 3-MA [23,39], which targets enzymes of the PI3K family [31,40]. Class III PI3K is probably engaged in the control of the formation of autophagic vacuoles [40], whereas the plasma-membrane-associated class I PI3K would be required to transduce a negative signal for the biogenesis of the autophagic vacuole [41]. Thus a possible explanation for the slight activation of proteolysis produced by 3-MA in the presence of FCS and amino acids is that, under these conditions, class I PI3K would be active and class III PI3K would be inactive or with very low activity, whereas the contrary may occur under SW or amino acid starvation. These possibilities remain to be investigated. From the differences in the inhibitions obtained with NH_4Cl + leupeptin and 3-MA, it appears also that lysosomal pathways different from macroautophagy are operating in the degradation of long-lived proteins. In fact, work with Apg5-deficient mouse embryonic stem cells, which are completely blocked in macroautophagy, has shown that lysosomal

pathways different from macroautophagy account for 30–40% of starvation-induced lysosomal protein degradation [42].

When we tested various proteasome inhibitors, we observed that MG132 and ALLN, two widely employed peptide aldehydes since they were introduced in 1994 [10], and which were quite efficient in inhibiting intracellular protein degradation, are not suited as specific inhibitors of proteasomes because they also inhibited lysosomal protein degradation to the same extent. In contrast, lactacystin [43], which was less effective than the other inhibitors in inhibiting protein degradation, was more adequate, since its effect was additive with that of NH_4Cl + leupeptin. The effects produced by epoxomicin [44] and clasto-lactacystin β -lactone [11] were indistinguishable from those observed with lactacystin. Therefore, when using the peptide aldehyde inhibitors (MG132, ALLN, etc.) to inhibit proteasomes because of their advantages (reversibility, inexpensiveness, etc.), it is advisable to demonstrate also similar effects with the more specific proteasomal inhibitors, as already recommended [22]. We also tested MG262, a drug belonging to the class of proteasome inhibitors which contain boronate and which includes PS-341 [32], a proteasome inhibitor used in multiple myeloma clinical trials [45]. MG262 was quite effective at very low concentrations and its inhibition was also additive with that of NH_4Cl + leupeptin. We could, however, not test the effects of PS-341 because it is not yet available commercially.

Lactacystin also interferes with lysosomal cathepsin A [46], but the protein-degradative role of this carboxypeptidase has been limited to hydrolysis of some regulatory peptides [47]. More recently, cathepsin A has been proposed to regulate chaperone-mediated autophagy by degrading lamp2a, the lysosomal receptor of this pathway [48]. However, due to the additive effects of lactacystin and lysosomal inhibitors, lactacystin does not appear to modify the lysosomal degradation of long-lived proteins under the conditions (i.e. 4 h SW) investigated here. Lactacystin at high concentrations is also known to inhibit the giant protease or tripeptidyl peptidase II [49]. Since we found that concentrations of lactacystin higher than 10 μM do not increase its inhibitory effect, and since epoxomicin [44], which is supposed to be more proteasome-specific than lactacystin, produces the same inhibition, it appears that this giant protease has here also a limited role in the overall degradation of long-lived proteins.

Changes in the growth conditions of cells involved alterations in the activities of the various proteolytic pathways. Proteasomes [6] certainly constitute an important proteolytic pathway for the degradation of long-lived proteins under all conditions; however, even in the presence of amino acids, they are responsible for half or less of this degradation. The remaining degradation occurs by lysosomal and non-lysosomal pathways. Particularly, and in agreement with results obtained by others in various cell types (see e.g. [3–5] for reviews), there is a notable increase in macroautophagic degradation of long-lived proteins under SW or amino acid deprivation. Less expected was the contribution of proteasomes to approx. 20% of the enhanced degradation of long-lived proteins in exponentially growing cells, which, at least in the absence of serum, is most probably due to activation of ubiquitin conjugation to proteins. It is usually believed that the enhanced degradation of proteins under SW or amino-acid deprivation is non-selective, and since proteasomes are involved in selective protein turnover [6], it is possible that only a specific group of proteins is multi-ubiquitinated, but this remains to be investigated. In contrast, lysosomal pathways different from macroautophagy appear not to be activated by SW or amino acid starvation, whereas their contribution, but not that of macroautophagy, increases under confluent conditions and prolonged serum starvation. This suggests a different kind of regulation of macroautophagy and the

other lysosomal pathways of intracellular protein degradation. In this regard, the morphological features of lysosomes in cells grown in the presence or absence of serum are different. Pathways different from macroautophagy have been proposed (see e.g. [18,19] for reviews). The processes responsible for lysosomal degradation in the presence of serum are unknown, but they could include microautophagy, which at least in hepatocytes appears to be regulated by factors different from those controlling macroautophagy [50]. In confluent cells under prolonged starvation, it has been postulated that the chaperone-mediated autophagic pathway is activated [19]. The percentage of protein degradation, in the presence or absence of amino acids, decreases under prolonged starvation, and this is mainly due to a strong reduction in macroautophagy. In contrast, the contribution to the degradation of long-lived proteins by lysosomal pathways different from macroautophagy increases, probably because the lysosomal degradation machinery needs to be more specific in selecting substrates that do not compromise cell viability, and chaperone-mediated autophagy fulfils these requirements better than macroautophagy.

In confluent cells, the relative contribution of proteasomes to the degradation of proteins decreases, especially in amino acid-deprived cells. This decrease was also observed when analysing the degradation of short-lived proteins [24]. Although the levels of ubiquitinated proteins did not apparently change under confluency, surprisingly we found, under confluent conditions and at least in the presence of amino acids, that the 19 S complex is partially replaced by the PA28 regulatory complex and that the proteolytically active β -subunits are replaced by the alternative β_1 -subunits of the immunoproteasome in a manner similar to that which occurs after interferon- γ stimulation [34]. Whether these changes could explain the decrease in proteasomal activity remains to be investigated.

In these studies, no combination of proteasomal and lysosomal inhibitors was able to suppress fully the degradation of long-lived proteins. It appears, therefore, that pathways different from proteasomes and lysosomes also operate in the degradation of intracellular proteins, albeit to a relatively low extent (approx. 15–20% of total degradation). These pathways appear to be inactivated in the absence of serum in exponentially growing cells and activated in the absence of amino acids in confluent cells. However, it is possible that some of the inhibitors used in the present study are unable to inhibit fully all the activities of their respectively affected pathways or, conversely, that some of these inhibitors also affect certain non-lysosomal and non-proteasomal pathways of protein degradation. Therefore calculation of the precise contribution of these pathways to the degradation of long-lived proteins would require the use of specific inhibitors of cytosolic (e.g. calpains) and organellar proteases [20,21].

In conclusion, our results demonstrate that: (i) certain inhibitors are more appropriate than others to investigate the participation of different proteolytic pathways in intracellular protein degradation; (ii) in human fibroblasts, lysosomes and proteasomes are equally responsible for a majority (80% or more) of the overall intracellular protein degradation; and (iii) the various proteolytic pathways are differently activated or inhibited under various growth conditions. Therefore these results should be useful to investigate the specific signals that control the activity of the various proteolytic pathways that degrade intracellular proteins.

This work was supported by the Ministerio de Ciencia y Tecnología (grant nos. BMC2001-0816 and SAF2002-00206), the Generalitat Valenciana (grant no. CTIDIB/2002/86) and the FIS (Fondo de Investigación Sanitaria) of the Instituto de Salud Carlos III, Red de Centros RGDM (G03/212), Madrid, Spain. We thank Rachael Z. Murray (University of Bristol, Bristol, U.K.) for helpful discussions and A. Montaner and D. Cerveró for technical assistance.

REFERENCES

- Hilt, W. and Wolf, D. H. (eds.) (2000) *Proteasomes: The World of Regulatory Proteolysis*, Landes Bioscience, Georgetown, TX
- Pillay, C. S., Elliott, C. and Dennison, C. (2002) Endolysosomal proteolysis and its regulation. *Biochem. J.* **363**, 417–429
- Goldberg, A. L. and St. John, A. C. (1976) Intracellular protein degradation in mammalian and bacterial cells: Part 2. *Annu. Rev. Biochem.* **45**, 747–803
- Mayer, R. J. and Doherty, F. (1986) Intracellular protein catabolism: state of the art. *FEBS Lett.* **198**, 181–193
- Gordon, P. B. and Seglen, P. O. (1989) Exogenous control of intracellular protein catabolism. In *Proteolytic Enzymes: A Practical Approach* (Beynon, R. J. and Bond, J. S., eds.), pp. 201–210. IRL Press, Oxford
- Glickman, M. H. and Ciechanover, A. (2002) The ubiquitin–proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol. Rev.* **266**, 21327–21330
- Hershko, A., Ciechanover, A. and Varshavsky, A. (2000) The ubiquitin system. *Nat. Med.* **6**, 1073–1081
- Murakami, Y., Matsufuji, S., Kameji, T., Hayashi, S., Igarashi, K., Tamura, T., Tanaka, K. and Ichihara, A. (1992) Ornithine decarboxylase is degraded by the 26 S proteasome without ubiquitination. *Nature (London)* **360**, 597–599
- Gandre, S. and Kahana, C. (2002) Degradation of ornithine decarboxylase in *Saccharomyces cerevisiae* is ubiquitin independent. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **293**, 139–144
- Rock, K. L., Gramm, C., Rothstein, L., Clark, K., Stein, R., Dick, L., Hwang, D. and Goldberg, A. L. (1994) Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell (Cambridge, Mass.)* **78**, 761–771
- Craiu, A., Gaczynska, M., Akopian, T., Gramm, C. F., Fenteany, G., Goldberg, A. L. and Rock, K. L. (1997) Lactacystin and clasto-lactacystin β -lactone modify multiple proteasome β -subunits and inhibit intracellular protein degradation and major histocompatibility complex class I antigen presentation. *J. Biol. Chem.* **272**, 13437–13445
- Pickart, C. M. (2000) Ubiquitin in chains. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 544–588
- Hirsch, C. and Ploegh, H. L. (2000) Intracellular targeting of the proteasome. *Trends Cell Biol.* **10**, 268–272
- Mortimore, G. E., Miotto, G., Venerando, R. and Kadowaki, M. (1996) Autophagy. *Subcell. Biochem.* **27**, 93–135
- Seglen, P. O., Berg, T. O., Blankson, H., Fengsrud, M., Holen, I. and Stromhaug, P. E. (1996) Structural aspects of autophagy. *Adv. Exp. Med. Biol.* **389**, 103–111
- Abeliovich, H. and Klionsky, D. J. (2001) Autophagy in yeast: mechanistic insights and physiological function. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**, 463–479
- Ohsumi, Y. (2001) Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 211–216
- Knecht, E., Martín de Llano, J. J., Andreu, E. and Moreno Miralles, I. (1998) Pathways for the degradation of intracellular proteins within lysosomes in higher eukaryotes. *Adv. Mol. Cell Biol.* **27**, 201–234
- Dice, J. F. (2000) *Lysosomal Pathways of Protein Degradation*, Landes Bioscience, Georgetown, TX
- Huang, Y. and Wang, K. K. (2001) The calpain family and human disease. *Trends Mol. Med.* **7**, 355–362
- Bota, D. A. and Davies, K. J. A. (2001) Protein degradation in mitochondria: implications for oxidative stress, aging and disease: a novel etiological classification of mitochondrial proteolytic disorders. *Mitochondrion* **1**, 33–49
- Lee, D. H. and Goldberg, A. L. (2000) The proteasome inhibitors and their uses. In *Proteasomes: The World of Regulatory Proteolysis* (Hilt, W. and Wolf, D., eds.), pp. 154–175. Landes Bioscience, Georgetown, TX
- Seglen, P. O. and Gordon, P. B. (1982) 3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79**, 1889–1892
- Fuertes, G., Villarroya, A. and Knecht, E. (2003) Role of proteasomes in the degradation of short-lived proteins in human fibroblasts under various growth conditions. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **35**, 651–664
- Brooks, P., Fuertes, G., Murray, R. Z., Bose, S., Knecht, E., Rechsteiner, M. C., Hendil, K. B., Tanaka, K., Dyson, J. and Rivett, A. J. (2000) Subcellular localization of proteasomes and their regulatory complexes in mammalian cells. *Biochem. J.* **346**, 155–161
- Knecht, E., Hernández-Yago, J. and Grisolia, S. (1984) Regulation of lysosomal autophagy in transformed and non-transformed mouse fibroblasts under several growth conditions. *Exp. Cell Res.* **154**, 224–232
- Palmer, A., Rivett, A. J., Thomson, S., Hendil, K. B., Butcher, G. W., Fuertes, G. and Knecht, E. (1996) Subpopulations of proteasomes in rat liver nuclei, microsomes and cytosol. *Biochem. J.* **316**, 401–407

- 28 Reidlinger, J., Pike, A. M., Savory, P. J., Murray, R. Z. and Rivett, A. J. (1997) Catalytic properties of 26 S and 20 S proteasomes and radiolabeling of MB1, LMP7, and C7 subunits associated with trypsin-like and chymotrypsin-like activities. *J. Biol. Chem.* **272**, 24899–24905
- 29 Realini, C., Jensen, C. C., Zhang, Z., Johnston, S. C., Knowlton, J. R., Hill, C. P. and Rechsteiner, M. (1997) Characterization of recombinant REG α , REG β , and REG γ proteasome activators. *J. Biol. Chem.* **272**, 25483–25492
- 30 Salvador, N., Aguado, C., Horst, M. and Knecht, E. (2000) Import of a cytosolic protein into lysosomes by chaperone-mediated autophagy depends on its folding state. *J. Biol. Chem.* **275**, 27447–27456
- 31 Blommaert, E. F. C., Krause, U., Schellens, J. P., Vreeling-Sindelarova, H. and Meijer, A. J. (1997) The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* **243**, 240–246
- 32 Adams, J., Behnke, M., Chen, S., Cruikshank, A. A., Dick, L. R., Grenier, L., Klunder, J. M., Ma, Y. T., Plamondon, L. and Stein, R. L. (1998) Potent and selective inhibitors of the proteasome: dipeptide boronic acid. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **8**, 333–338
- 33 Ravid, T., Doolman, R., Avner, R., Harats, D. and Roitelman, J. (2000) The ubiquitin–proteasome pathway mediates the regulated degradation of mammalian 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A. *J. Biol. Chem.* **275**, 35840–35847
- 34 Rivett, A. J., Bose, S., Brooks, P. and Broadfoot, K. I. (2001) Regulation of proteasome complexes by γ -interferon and phosphorylation. *Biochimie* **83**, 363–366
- 35 Breitschopf, K., Bengal, E., Ziv, T., Admon, A. and Ciechanover, A. (1998) A novel site for ubiquitination: the N-terminal residue, and not internal lysines of MyoD, is essential for conjugation and degradation of the protein. *EMBO J.* **17**, 5964–5973
- 36 Blommaert, E. F., Luiken, J. J. and Meijer, A. J. (1997) Autophagic proteolysis: control and specificity. *Histochem. J.* **29**, 365–385
- 37 Seglen, P. O. (1983) Inhibitors of lysosomal function. *Methods Enzymol.* **96**, 737–764
- 38 Wilcox, D. and Mason, R. W. (1992) Inhibition of cysteine proteinases in lysosomes and whole cells. *Biochem. J.* **285**, 495–502
- 39 Seglen, P. O., Gordon, P. B., Tolleshaug, H. and Høyvik, H. (1986) Use of [³H]raffinose as a specific probe of autophagic sequestration. *Exp. Cell Res.* **162**, 273–277
- 40 Petiot, A., Ogier-Denis, E., Blommaert, E. F. C., Meijer, A. J. and Codogno, P. (2000) Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. *J. Biol. Chem.* **275**, 992–998
- 41 Kihara, A., Noda, T., Ishihara, N. and Ohsumi, Y. (2001) Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **152**, 519–530
- 42 Mizushima, N., Yamamoto, A., Hatano, M., Kobayashi, Y., Kabeya, Y., Suzuki, K., Tokuhiwa, T., Ohsumi, Y. and Yoshimori, T. (2001) Dissection of autophagosome formation using App5-deficient mouse embryonic stem cells. *J. Cell Biol.* **152**, 657–667
- 43 Fenteany, G., Standaert, R. F., Lane, W. S., Choi, S., Corey, E. J. and Schreiber, S. L. (1995) Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. *Science* **268**, 726–731
- 44 Meng, L., Mohan, R., Kwok, B. H. B., Elofsson, M., Sin, N. and Crews, C. M. (1999) Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits *in vivo* anti-inflammatory activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 10403–10408
- 45 Garber, K. (2002) Taking garbage in, tossing cancer out? *Science* **295**, 612–613
- 46 Ostrowska, H., Wójcik, C., Wilk, S., Omura, S., Kozłowski, L., Stokłosa, T., Worowski, K. and Radziwon, P. (2000) Separation of cathepsin A-like enzyme and the proteasome: evidence that lactacystin/ β -lactone is not a specific inhibitor of the proteasome. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **32**, 747–757
- 47 Itoh, K., Kase, R., Shimmoto, M., Satake, H. and Suzuki, Y. (1995) Protective protein as an endogenous endothelin degradation enzyme in human tissues. *J. Biol. Chem.* **270**, 515–518
- 48 Cuervo, A. M., Mann, L., Bonten, E. J., d'Azzo, A. and Dice, J. F. (2003) Cathepsin A regulates chaperone-mediated autophagy through cleavage of the lysosomal receptor. *EMBO J.* **22**, 47–59
- 49 Geier, E., Pfeifer, G., Wilm, M., Lucchiari-Hartz, M., Baumeister, W., Eichmann, K. and Niedermann, G. (1999) A giant protease with potential to substitute for some functions of the proteasome. *Science* **283**, 978–981
- 50 Mortimore, G. E., Lardeux, B. R. and Adams, C. E. (1988) Regulation of microautophagy and basal protein turnover in rat liver. Effects of short-term starvation. *J. Biol. Chem.* **263**, 2506–2512

Received 19 February 2003/23 June 2003; accepted 4 July 2003

Published as BJ Immediate Publication 4 July 2003, DOI 10.1042/BJ20030282